

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BÁRBARA BARBI DE FREITAS

IDENTIFICAÇÃO DE ANIMAIS PERSISTENTEMENTE INFECTADOS (PI)
COM O VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA E AVALIAÇÃO DOS SÓLIDOS
DO LEITE E CCS APÓS A ELIMINAÇÃO DOS PIS EM PROPRIEDADES
LEITEIRAS NO ESTADO DO PARANÁ

CURITIBA
2019

BÁRBARA BARBI DE FREITAS

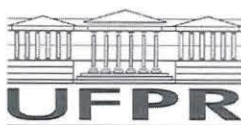
IDENTIFICAÇÃO DE ANIMAIS PERSISTENTEMENTE INFECTADOS (PI)
COM O VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA E AVALIAÇÃO DOS SÓLIDOS
DO LEITE E CCS APÓS A ELIMINAÇÃO DOS PIS EM PROPRIEDADES
LEITEIRAS NO ESTADO DO PARANÁ

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Ivan Roque de Barros Filho

CURITIBA
2019

F866i Freitas, Bárbara Barbi de
Identificação de animais persistentemente infectados com o vírus da diarreia viral bovina e sua influência na contagem de células somáticas e sólidos do leite em propriedades leiteiras no estado do Paraná / Bárbara Barbi de Freitas. - Curitiba, 2019.
66 p.: il.,
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Orientador: Ivan Roque De Barros Filho
1. Bovinos de leite. 2. Diarreia em bovino. 3. Leite - Produção - Paraná. I. Barros Filho, Ivan Roque De (Orientador). II. Título. III. Universidade federal do Paraná.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS - 40001016023P3

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **BÁRBARA BARBI DE FREITAS** intitulada: **IDENTIFICAÇÃO DE ANIMAIS PERSISTENTEMENTE INFECTADOS (PI) COM O VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA E AVALIAÇÃO DOS SÓLIDOS DO LEITE E CCS APÓS A ELIMINAÇÃO DOS PIS EM PROPRIEDADES LEITEIRAS NO ESTADO DO PARANÁ**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 18 de Março de 2019.

IVAN ROQUE DE BARROS FILHO
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

MARLISE POMPEO CLAUS
Avaliador Externo (IFC)

JOÃO HENRIQUE PEROTTA
Avaliador Externo (UFPR/DMV)

RESUMO

Esse trabalho deve estabelecer a prevalência de animais persistentemente infectados (PI) com o BVDV em propriedades leiteiras no estado do Paraná, bem como avaliar a influência desses animais na contagem de células somáticas (CCS) e sólidos do leite. Foram coletadas amostras de fragmento de orelha de 6.465 bovinos, fêmeas, da raça Holandês Preto e Branco (HPB). Amostraram-se animais com idade inferior a dois anos, fêmeas com mais de dois anos que não haviam tido partos na propriedade, e mães de bezerros que foram diagnosticados como persistentemente infectados. Os bovinos foram provenientes de 40 rebanhos leiteiros, distribuídos em dez municípios no Estado do Paraná. A coleta deu-se no período de maio de 2015 a agosto de 2018. O diagnóstico dos animais PI foi feito por meio do teste de ELISA de captura de antígeno. Animais PI foram detectados em quinze rebanhos amostrais (37,5%), oscilando entre um e dezesseis animais por rebanho. A prevalência nos municípios do estado Paraná foi de 1,78%, oscilando entre 0,3 a 8,9% nos rebanhos positivos. Com a alta prevalência de animais PI observada, quando analisados os rebanhos amostrais individualmente, é possível afirmar que há uma disseminação importante do BVDV em municípios paranaenses, destacando inclusive áreas endêmicas. Com isso, vê-se a necessidade de medidas de conscientização dos produtores sobre a existência e importância da BVD nos rebanhos, destacando o papel dos animais PI na epidemiologia da doença, bem como o impacto econômico causado pela manutenção desses animais nos rebanhos. Foram selecionadas duas propriedades para avaliação do controle leiteiro anteriormente e durante a retirada dos animais PI. Para a identificação dos animais PI, foi coletado um fragmento de orelha de cada animal e encaminhado ao laboratório de diagnóstico da APCBRH, onde foi realizado o teste de ELISA. Para a avaliação dos sólidos totais do leite e contagem de células somáticas foram coletadas amostras mensalmente por pessoal treinado das indústrias de laticínio. Os dados de controle leiteiro foram coletados junto à APCBRH. As propriedades foram identificadas neste estudo como A e B. Na propriedade A foi detectado um total de 13 animais PI, representando uma prevalência de 3,6% (13/362), enquanto que na propriedade B foram diagnosticados 15 animais PI, apresentando prevalência de 3,5% (15/434). No ano seguinte a detecção e eliminação dos persistentemente infectados os valores de contagem de células somáticas (CCS) reduziram em ambas as propriedades. Foi notado na propriedade A, que nos anos de 2016 e 2017, período de retirada dos animais PI, redução da CCS e aumento do percentual de proteína significativo. Na propriedade B foi observado aumento no percentual de gordura, lactose e maior produção de leite no ano da retirada dos PI. No período de 12 meses anteriores e durante a retirada dos animais PI não foram observadas diferenças significativas nos percentuais de gordura, proteína e lactose, na propriedade A. Enquanto, na propriedade B, notou-se diferença apenas no percentual de gordura. As diferenças significativas encontradas na composição de sólidos do leite, CCS e na produção, podem estar relacionadas com a presença do BVDV no rebanho. Acredita-se que estes parâmetros podem alterar-se devido à presença do vírus aumentar a quantidade de células somáticas na glândula mamária, evento este que influencia diretamente os componentes do leite.

Palavras-chave: infecção persistente, BVDV, leite, células somáticas.

ABSTRACT

The aim of this study is to establish the prevalence of persistently infected animals with BVDV (PI) in dairy farms in Paraná State, as to evaluate the influence with these animals in the somatic cell count (CCS) and total solids. Samples were collected as a fragment of the ear in 6.465 female bovines of Holstein-Friesian breed (HPB), under two years old, females older than this which did not had a birth at that farm and cows that gave birth to calves that were diagnosed as persistently infected. The bovines came from 40 herds of dairy cows, distributed in ten cities of Paraná State, Brazil. The sampling began in may, 2015 until august, 2018. The PI animals were diagnosed with with ELISA test for the antigen capture. PI animals were detected in fifteen sample herds (37,5%), oscillating between one and sixteen animals per herd. The prevalence of cities in Paraná State were 1,78% oscillating between 0.3 and 8.9% in positive herds. With the high prevalence of PI animals observed, when the herds are analysed individually, it is possible to state that is a important dissemination of BVDV in cities of Paraná State, highlighting endemic areas. With that, is possible to see the necessity of measures of awareness the producers of the existence and importance of BVD in the herds, as well as the economic impact done by the maintenance of these animals in the herd. Two farms were selected for the evaluating the previous milk control and during the PI animals removal. To identify this PI animals it was collected a fragment of the ear of each animal, this was send to the diagnose laboratory of APCBRH where the ELISA test was realized. To evaluate the total solids in the milk and for the somatic counting cell samples were collected monthly by trained crew in the milk industry. The data of milk control were collected with the APCBRH. In this study the farms were identified as A and B. In farm A a total of 13 PI animals were detected, this represents 3,6% of prevalence (13/362), while in property B 15 PI animals were detected presenting prevalence of 3,5%(15/434). In the year post detection and elimination of the PI animals the values of somatic cell counting (CCS) were less in both properties. It was noticed in farm A, that in year 2016 and 2017, period of animals removal, there were reduction in CCS and a significantly increase in protein percentage. In farm B there were observed an increase in fat, lactose and higher milk production in the same year of the PI animals removal. In the period of 12 months before and during the PI animals removal, there werent observed significantly differences in fat percentage, protein and lactose, in farm A. The significant differences that were found in the milk solids composition, CCS and production, can be related with the presence of BVDV in the herd. It is supposed that this parameters can change due to the presence of the virus increase the amount of somatic cells in the mammary gland, this event influences directly the milk components.

Key-Words: persistent infeccion, BVDV, milk, somatic cells.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 - Prevalência de bovinos persistentemente infectados com o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em rebanhos leiteiros no estado do Paraná, Brasil

TABELA 1. Distribuição da coleta de amostras de fragmento de orelha para detecção de animais PI com o BVDV em municípios no estado do Paraná, Brasil.....43

TABELA 2. Animais positivos no teste de detecção de antígeno, prevalência de animais PI (%), quantidade e prevalência de rebanhos positivos para BVDV.....44

TABELA 3. Prevalência (%) de animais PI BVDV em rebanhos bovinos leiteiros em municípios do estado do Paraná, Brasil.....45

CAPÍTULO 3 - Avaliação dos sólidos do leite e contagem de células somáticas durante a eliminação de bovinos animais persistentemente infectados com o vírus da diarreia viral bovina em propriedades leiteiras no estado do Paraná, Brasil

TABELA 1. Média, desvio padrão e valores de p pelo Teste T pareado na avaliação da composição de sólidos do leite, CCS e produção leiteira durante o período de 2015, 2016 e 2017 em propriedade especializada de produção leiteira, compreendendo o período anterior e durante a retirada dos animais persistentemente infectados com o BVDV, propriedade A58

TABELA 2. Média, desvio padrão, valores de p pelo Teste T pareado na avaliação da composição de sólidos do leite e produção leiteira. Mediana e valor de p pelo Teste de Wilcoxon pareado para CCS, durante o período de 2016, 2017 e 2018 em propriedade especializada de produção leiteira, compreendendo o período anterior e durante a retirada dos animais persistentemente infectados com o BVDV, propriedade B.....58

TABELA 3. Média, desvio padrão e valores de p pelo Teste T pareado na avaliação da composição de sólidos do leite e produção leiteira, nos períodos de 12 meses antes e durante a retirada dos animais PI, propriedade A.....59

TABELA 4. Média, desvio padrão e valores de p pelo Teste T pareado na avaliação da composição de sólidos do leite e produção leiteira, nos períodos de 12 meses antes e durante a retirada dos animais PI, propriedade B.....59

TABELA 5. Mediana e valores de p pelo teste de Wilcoxon Pareado na avaliação da CCS, nos períodos de 12 meses antes e durante a retirada dos animais PI, nas propriedades A e B.....59

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1. Disposição genômica das proteínas estruturais e não estruturais do BVD15

FIGURA 2. Adaptado de Ridpath; Flores et al. (2007). Consequências da infecção de fêmeas bovinas prenhes pelo BVDV, de acordo com o biótipo do vírus e com o estágio de gestação20

FIGURA 3. Adaptado de Moennig et al. (2005). Fluxograma representando estratégia de controle de BVD na Alemanha. A pesquisa de animais PI é essencial nesse processo28

CAPÍTULO 2 - Prevalência de bovinos persistentemente infectados com o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) rebanhos leiteiros no estado do Paraná, Brasil

FIGURA 1. Localização geográfica dos municípios amostrados no Estado do Paraná42

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Apaf-1 – Fator de ativação de apoptose

BALT – Tecido linfoide associado aos brônquios

BVD – Diarreia viral bovina

BVDV – Vírus da diarreia viral bovina

CCS – Contagem de células somáticas

cp – Citopático

ELISA – Ensaio imunoenzimático

GALT – Tecido linfoide associado aos intestinos

IF – Imunofluorescência

IFN-1 – Interferon tipo 1

IPX - Immunoperoxidase

NALT – Tecido linfoide associado às vias nasais

ncp – Não-citopático

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos

RT-PCR – Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase

PI – Persistentemente infectado

PRRs – Receptores de reconhecimento de padrões

TLR – Receptores do tipo Toll-like

TNF – Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo geral	12
2.2. Objetivos específicos	12
3. CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1. DIARREIA VIRAL BOVINA	13
3.1.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	13
3.1.2. ETIOLOGIA	14
3.1.3. PATOGENIA	16
3.1.3.1. Infecção aguda	18
3.1.3.2. Infecção fetal	19
3.1.3.3. Persistentemente infectados	20
3.1.3.4. Infecção pós-natal	23
3.1.3.5. Doença das mucosas	23
3.1.4. PATOLOGIA	24
3.1.5. SINAIS CLÍNICOS	25
3.1.6. DIAGNÓSTICO	26
3.1.7. CONTROLE E ERRADICAÇÃO	27
CONSIDERAÇÕES FINAIS	28
REFERÊNCIAS	28
4. CAPÍTULO 2 - Prevalência de bovinos persistentemente infectados com o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em rebanhos leiteiros no estado do Paraná, Brasil	39
Introdução	40
Material e métodos	41
Resultados	44
Discussão	45
Conclusão	48
Referências	49
5. CAPÍTULO 3 – Avaliação dos sólidos do leite e contagem de células somáticas durante a eliminação de bovinos persistentemente infectados com o vírus da diarreia viral bovina em propriedades leiteiras no estado do Paraná,	

Brasil.....53

 Introdução54

 Material e métodos55

 Resultados.....57

 Discussão59

 Conclusão.....63

 Referências63

1. INTRODUÇÃO

O setor de bovinocultura brasileiro tem sido um dos maiores destaques no agronegócio mundial. A população de bovinos em fazendas brasileiras cresce continuamente, sendo que em 2016 o país atingiu 218,2 milhões de cabeças de gado bovino e uma produção de leite de 33,6 milhões de litros (IBGE, 2017). Com isso as preocupações com a sanidade, qualidade de produção e eficiência dos rebanhos se torna imprescindível.

A diarreia viral bovina é uma das doenças infecciosas de grande importância no setor de bovinocultura leiteira mundial. Tal importância se deve às perdas reprodutivas e de produção no setor, o que tem gerado significativos prejuízos econômicos (Hessman et al., 2009). A enfermidade é endêmica no Brasil e em vários países do mundo. O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) não só acomete espécies domésticas, como também mamíferos selvagens, no entanto os estudos em outras espécies ainda são escassos (Passler; Walz, 2010).

A doença é causada pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV), pertencente ao gênero *Pestivirus*, um RNA vírus. O vírus é classificado em BVDV subgenótipo 1 (BVDV-1) e BVDV subgenótipo 2 (BVDV-2), com base nas diferenças genéticas e resposta antigênica, sendo que o primeiro representa a forma de maior prevalência (Vilcek et al., 2005). O vírus também recebe uma classificação de acordo com seu comportamento em cultivo celular em dois biótipos, citopatogênico e não citopatogênico. O biótipo não citopatogênico é responsável pela maioria das infecções naturais e infecções persistentes (Flores, 2017).

Uma característica importante do BVDV é a imunossupressão marcada por linfopenia (Brodersen, 2014). Com isso, o animal se torna mais susceptível às infecções secundárias (Peterhans; Jungi; Schweizer, 2003). Em casos de infecção aguda com acometimento dos sistemas respiratório e digestivo, o animal pode desenvolver sinais de febre, diarreia, depressão, redução do apetite, taquipneia e erosões na mucosa oral (Brodgen; Guthmiller, 2002).

A forma de manutenção do BVDV em um rebanho é por meio da existência de animais persistentemente infectados com o vírus (Houe, 1995). Quando a fêmea se infecta com o BVDV não citopatogênico no primeiro trimestre da gestação (40 a 120 dias) há grande probabilidade da formação de indivíduos denominados persistentemente infectados (PI) (Grooms, 2004). Estes são

imunotolerantes ao vírus e o reconhecem como próprio, portanto não desenvolvem imunidade contra o agente, porém eliminam o vírus em suas secreções e excreções durante toda sua vida (Arenhart et al., 2009). Os animais PI podem apresentar-se sadios no nascimento, crescerem normalmente e tornarem-se membros produtivos no rebanho. No entanto, também podem ser animais fracos, que adoecem frequentemente, com atraso de crescimento, por vezes vistos como refugo (Baker, 1995). Os PI não possuem anticorpos anti-BVDV, o que dificulta a sua identificação, assim eles permanecem como a principal fonte de infecção no rebanho (Bauermann et al., 2014).

Embora os animais PI possam ser clinicamente saudáveis, sua expectativa de vida é baixa. Suspeita-se que estes animais tenham uma deficiência imunitária, cursando com infecções intercorrentes, podendo estas ser de origem bacteriana, fúngica ou viral (Dias et al., 2010). Eles também podem desenvolver uma mutação da forma do biótipo não citopático, este se tornar citopático e o animal desenvolver a doença das mucosas (Khodakaram-tafti; Farjanikish, 2017). Neste caso ele apresenta os sinais característicos da enfermidade em sua forma aguda como febre, depressão, redução de apetite, queda na produção de leite, lesões digitais, lesões na mucosa oral que levam a sialorreia (Baker, 1990; Kelling, 2004; Lanyon et al., 2014). Em apresentação hiperaguda pode-se observar um quadro hemorrágico, com diarreia profusa sanguinolenta e trombocitopenia marcante (Fino et al., 2012).

O diagnóstico da doença pode ser feito por método sorológico, por meio de ELISA indireto para pesquisa de anticorpos contra o agente, ou ELISA direto para detecção do antígeno, sendo este último mais eficaz para identificação dos animais PI. Outras formas de diagnóstico constituem a vírus-neutralização, reação em cadeia da polimerase precedida de transcriptase reversa (RT-PCR) para detecção do RNA viral e isolamento em cultivo celular (Flores, 2017; Ridpath, 2010).

Em estudos relacionando a presença do BVDV na propriedade com a qualidade do leite por meio da contagem de células somáticas (CCS), foi constatado que rebanhos leiteiros com ausência de BVDV apresentavam menor contagem de células somáticas no leite (Laureyns et al., 2013). Isto demonstra que a presença do vírus na propriedade, além de muitas outras consequências negativas, também interfere na produção e qualidade do leite, demonstrando a

importância do diagnóstico e controle desta doença nos rebanhos leiteiros.

A principal forma de controle da doença no rebanho é por meio da identificação e eliminação dos animais persistentemente infectados (Smith; Grotelueschen, 2004). Alguns países europeus como a Alemanha, Suíça e Irlanda, que basearam seus programas de erradicação dos animais PI, têm apresentado bons resultados (Thomann et al., 2017; Thulke et al., 2017; Wernike et al., 2017). A prevenção da doença é feita por meio de protocolo de vacinal anual, e a vacina com o BVDV geralmente encontra-se associada a outros agentes causadores de doenças reprodutivas, possibilitando uma prevenção conjunta a outras enfermidades (Dean et al., 2003). Testes sorológicos periódicos nos animais do rebanho são importantes para avaliar a titulação, principalmente após compra de animais, sendo que estes devem ser oriundos de propriedades controladas para BVD e devem ser submetidos a período de quarentena para introdução na propriedade (Dias et al., 2010).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo identificar bovinos persistentemente infectados com o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em rebanhos leiteiros no estado do Paraná.

2.2. Objetivos específicos

- Estabelecer a prevalência de animais persistentemente infectados com o BVDV em rebanhos de bovinos leiteiros do estado do Paraná.
- Avaliar os dados de controle leiteiro antes, durante e após a eliminação dos animais PI dos rebanhos.

3 CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA

3.1. DIARREIA VIRAL BOVINA

3.1.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

A diarreia viral bovina foi descrita pela primeira vez por Childs (1946) no oeste do Canadá na província de Saskatchewan. A doença apresentava forma aguda, que acometia animais jovens, cursando com hipertermia, diarreia profusa, desidratação, anorexia, sialorréia e desenvolvimento de úlceras no focinho, língua e mucosa da cavidade oral. A forma subaguda acometia animais adultos com sinais clínicos mais leves (Childs, 1946). No mesmo ano foi relatada doença semelhante em Nova Iorque, mas com adição de sinais respiratórios, falhas reprodutivas e queda na produção de leite. Neste estudo foram observadas infecções naturais e experimentais. Tentaram isolar o agente em meio de cultura, porém não obtiveram sucesso, o que os fez concluir que não se tratava de um agente bacteriano e sim viral (Olafson et al., 1946).

Atualmente a doença é distribuída mundialmente, sendo endêmica em vários países. É responsável por perdas econômicas em decorrência de falhas reprodutivas, abortamentos e queda na produção de leite (Heuer et al., 2007). Devido ao caráter prejudicial tanto econômico quanto à saúde dos animais, o BVDV tem sido amplamente estudado com intuito de estabelecer a soroprevalência em países e regiões, aperfeiçoar o entendimento de sua patogenicidade, que é bastante complexa, bem como buscar estratégias de erradicação do vírus. Na Turquia, Tan et al. (2006) descreveram soroprevalência de 86% para o BVDV, enquanto a prevalência de anticorpos anti-BVDV no sul do Vietnã foi de 82% (Duong et al., 2008). Em seus estudos, Guarino et al. (2008) e Lee et al. (2008) relataram soroprevalência de 69% e 58%, no Uruguai e na Coreia do Sul, respectivamente. Na Jordânia, a prevalência encontrada por Talafha et al. (2009) foi de 31,6%.

No rebanho bovino brasileiro também há uma ampla distribuição do vírus. Em estudo na região sul do Rio Grande do Sul, Quincozes et al. (2007) encontraram soroprevalência de BVDV de 66,32% nos rebanhos amostrais, enquanto Dias e Samara (2003) relataram prevalência 57,18% de animais soropositivos em rebanhos no sul do estado de Minas Gerais e nordeste do

estado de São Paulo. No estado do Paraná em um estudo realizado por Flores et al. (2005), foi descrita uma soroprevalência para o BVDV de 61,5% em amostras processadas em testes de vírus-neutralização (VN).

A prevalência de animais PI na população bovina mundial possui grande oscilação. Em estudos realizados em estados do sul e sudeste dos Estados Unidos, Fulton et al. (2006) encontraram prevalência de 0,4% de animais persistentemente infectados com o BVDV, num total de 21.743 testados. No Brasil, a pesquisa de animais PI ainda é escassa. Em estudo no oeste do Paraná foi achado por Dezen et al. (2013) uma prevalência de 0,29% num total de 692 animais amostrados.

Os bovinos portadores da doença eliminam o vírus em descarga nasal, leite, urina e na saliva (Radostits; Littlejohns, 1988; Meyling et al., 1990; Lanyon et al., 2014). Os animais PI representam os principais reservatórios e fontes de disseminação do BVDV no rebanho, isto porque eles eliminam grandes quantidades do vírus em suas secreções (nasais, saliva, sêmen, leite) e excreções (urina e fezes) (Grooms, 2006).

A transmissão do agente se dá de forma direta, por meio do contato com animais PI, ou com animais transitoriamente infectados, mas a excreção do vírus por estes é consideravelmente inferior e por menor tempo do que pelos PI (Arenhart et al., 2009). E também de forma indireta por meio de luvas de palpação, agulhas, tatuadores, aplicadores de brinco, currais e cochos contaminados com secreções e excreções contendo BVDV, além de fluídos e anexos fetais (Lindberg, 2003; Flores, 2017).

3.1.2. ETIOLOGIA

A enfermidade tem como agente etiológico o Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV), que se trata de um vírus envelopado, RNA fita simples, pertencente ao Reino *Riboviria*, família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus* (ICVT, 2018b). Esse gênero é caracterizado por partículas virais com dimensões de 40-60 nm com formato esférico, com presença de capsídeo icosaédrico e envelope de composição lipídica (Krey et al., 2006). Assim como outros membros do gênero *Pestivirus*, o BVDV tem 12,5Kb, e a fita simples de RNA polaridade positiva possui duas regiões não traduzidas próximas às extremidades 5' e 3' (Cortez et

al., 2006).

Possui uma única janela de leitura (ORF) (Flores, 2017), que de acordo com Collett et al. (1988) tem capacidade de codificação de uma poliproteína com 3988 aminoácidos, representando 449 kDa de proteína. As proteínas codificadas são classificadas de acordo com sua função na partícula viral. As estruturais são utilizadas na montagem e construção da progênie viral, são representadas por C, E^{ns}, E1 e E2, enquanto as proteínas não estruturais auxiliam na clivagem da poliproteína e atuam na replicação do genoma viral, sendo essas a N^{pro}, p7, NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B (Yesilbag et al., 2008). A disposição das proteínas virais no genoma do BVDV está demonstrada na figura 1.



Figura 1. Adaptado de Ridpath; Flores (2007). Disposição genômica das proteínas estruturais e não estruturais do BVDV.

O vírus é responsável por infecções multissistêmicas, acometendo o sistema respiratório, reprodutivo e gastrointestinal e a imunossupressão é a principal causa do aparecimento da doença clínica (Baker, 1995). O BVDV é classificado em dois genótipos BVDV-1 e BVDV-2, com base na comparação da sequência de nucleotídeos das regiões 5' região não traduzida (5'UTR), N^{pro} e E² (Vilcek et al., 2001). O BVDV ainda é dividido em subgenótipos com base na análise filogenética das sequências 5'UTR e N^{pro} (Vilcek et al., 2001).

Em estudos recentes na Itália por Giammarioli et al. (2015) foram identificados dez subgenótipos do BVDV-1 circulantes no país. Na China, Xue et al. (2010) sequenciaram 18 subgenótipos do BVDV tipo 1. No Brasil entre os anos de 1995 e 2014, de acordo com Silveira et al. (2015) foram isolados quatro subgenótipos do tipo 1 sendo eles BVDV-1 a,b,d,e, e três do tipo 2, BVDV-2 a,b,c. Ambos os genótipos estão associados às infecções agudas e persistentes, porém algumas cepas de BVDV-2 também podem estar relacionadas aos casos de hemorragia grave (Carman et al., 1998).

Também podem ser diferenciados em dois biótipos, citopático (cp) e não

citopático (ncp) (Xue et al., 2010). Esta diferenciação se dá pela capacidade do vírus em provocar vacuolização citoplasmática, afetando a integridade da célula cultivada e causando sua morte, este processo é denominado efeito lítico (Santos; Alessi, 2010). Este efeito está diretamente relacionado com o comportamento patogênico da cepa viral *in vitro* e com o estabelecimento de sinais clínicos distintos. A forma não-citopática é capaz de atravessar a placenta invadir o feto e estabelecer infecção persistente, sendo que estes bovinos infectados de forma congênita são a principal fonte de infecção nos rebanhos (Dean et al., 2003).

O biótipo citopático apresenta-se geralmente associado à doença das mucosas em animais PI (Peterhans et al., 2010). Em 1984 Brownlie e colaboradores realizaram experimento com indução da doença das mucosas em animais PI com a cepa não citopática do BVDV. Com a inoculação de cepas citopáticas em animais PI e em animais sadios, puderam evidenciar que apenas os animais PI com o BVDV desenvolveram a doença das mucosas dentro de quatro semanas após a inoculação, enquanto que os sadios apenas desenvolveram anticorpos contra o vírus. Há evidências de que o biótipo citopático surge por mutação do biótipo não-citopático nos animais PI. Esta mutação se dá por meio de rearranjos genéticos com duplicações e inserções de genoma viral ou celular no vírus não-citopático (Megid et al., 2016).

3.1.3. PATOGENIA

O BVDV infecta grande variedade de tipos celulares, no entanto possui predileção por células do sistema imune (Glew et al., 2003). O vírus invade linfócitos T e B, e células apresentadoras de antígenos (Sopp et al., 1994). Também podem acometer neutrófilos, monócitos e macrófagos, comprometendo as funções fagocíticas e quimiotáticas das células (Potgieter, 1995).

O vírus se dissemina por meio da circulação linfática atingindo linfonodos, posteriormente chega à circulação sanguínea, onde se distribui entre os linfonodos, tecido linfoide associado às vias nasais (NALT), tecido linfoide associado aos brônquios (BALT), além de acometer órgãos hematopoiéticos como timo e baço (Liebler-Tenorio et al., 1997). Conforme o aumento da virulência da cepa, mais tecidos são acometidos, como medula óssea, epitélio do trato gastrointestinal, trato respiratório, trato urogenital, coração e pele (Goyal;

Ridpath, 2005).

Os biótipos diferem em sua predileção de células de replicação, o não citopatogênico apresenta tropismo por leucócitos, células dos tecidos linfoides, glândula parótida, cólon proximal e trato respiratório, enquanto que o citopatogênico está associado com o trato gastrointestinal e replicação nos ovários (Liebler et al., 1991; Grooms et al., 1998; Goyal; Ridpath, 2005). O BVDV adentra o organismo do animal pelas mucosas nasal e oral. E o primeiro sítio de replicação viral são as células epiteliais das tonsilas e tecido linfoide da orofaringe (Liess, 1990; Khodakaram-Tafti; Farjanikish, 2017).

Os tecidos linfoides são caracterizados pela presença de um epitélio especializado, formado por células M (células de microenvoltório), leucócitos intra-epiteliais e folículos linfoides na lâmina própria (Schuh; Oliphant, 1992). As células M desempenham um papel imprescindível para a entrada do vírus no organismo, pois essas células realizam um processo denominado transcitose de antígenos, sendo uma combinação de endocitose e exocitose (Palmer et al., 2011). A função das células M é absorver os antígenos e apresentá-los imediatamente aos linfócitos intra-epiteliais, porém alguns agentes podem escapar à ação da célula M, utilizando-a para adentrar o organismo e se disseminar entre as células dos tecidos linfoides (Tizard, 2014).

A glicoproteína E^{ms} é o componente mediador da aderência do vírus às células alvo, de acordo com alguns estudos a entrada se dá pela ligação da glicoproteína E^{ms} à sulfato de heparano e outros glicosaminoglicanos presentes na superfície celular (Iqbal et al., 2000). Também foi constatado que o CD46 bovino (proteína co-fator de membrana) é um receptor do BVDV nas membranas de macrófagos e linfócitos do hospedeiro (Maurer et al., 2004). Após a ligação ao receptor, ocorre a endocitose mediada por clatrina, o BVDV, que é ácido resistente, sofre desestabilização durante a endocitose para permitir a fusão dentro do compartimento endossomal ácido (Krey et al., 2006; Lecot et al., 2005). A glicoproteína E2 é o elemento mais imunogênico do vírus, sendo atribuída a ela a indução da síntese de anticorpos neutralizantes (Nelson et al., 2012).

Em estudos primários acreditava-se que o BVDV não possuía capacidade de infectar oócitos e estágios embrionários precoces (Bielanski; Hare, 1988). Mais tarde em estudo realizado por Fray et al. (1998) foi observado que oócitos bovinos são capazes de suportar a replicação do BVDV, destacando o potencial de

transmissão do vírus por meio da linhagem germinativa. E em estudos recentes, avaliando exposição de oócitos bovinos, livres de zona pelúcida. Previamente maturados *in vitro*, ao BVDV ncp, comprovou-se que o vírus manteve sua infecciosidade, demonstrando que oócitos maduros são susceptíveis ao BVDV (Altamiranda et al., 2016). Este fato destaca a importância do controle da doença para uso de biotecnologias da reprodução como fertilização *in vitro* e transferência de embriões.

Em touros experimentalmente infectados com cepa não-citopática do BVDV, foi observada replicação viral em vesícula seminal e próstata, além da verificação da excreção do agente no sêmen (Kirkland et al., 1991). Além disso, a infecção pode comprometer a qualidade do sêmen temporariamente (Lindberg, 2003). Em estudo realizado por Givens et al. (2003) touros soronegativos foram inoculados por via intranasal com BVDV. Foi constatada a presença do vírus no sêmen de alguns animais por até sete meses após a inoculação, enfatizando que o BVDV pode persistir no sêmen de touros com infecção aguda por vários meses após a exposição.

3.1.3.1. Infecção aguda

A infecção com o BVDV ncp em animais não gestantes, imunocompetentes, mas que não possuem anticorpos contra o agente, se desenvolve na forma de viremia transitória (Niskanen; Lindberg, 2003). O animal apresenta sinais clínicos em um período de três dias após a exposição ao agente. Dentro de 10 a 14 dias ele encontra-se em viremia, que compreende o processo de eliminação do vírus por secreções e excreções.

A redução dos leucócitos circulantes está relacionada a apoptose de linfócitos e supressão da função dos macrófagos, que é grave nos tecidos linfoides associados aos intestinos (GALT). Este processo ocorre pela inativação da caspase- 9 em linfonodos, tecido linfoide associado aos brônquios e tecido linfoide associado aos intestinos (Liebler-tenorio et al., 2003; Lanyon et al., 2014).

A regulação da apoptose pode ocorrer por duas vias distintas, a via extrínseca, que é caracterizada pela presença de receptores do fator de necrose tumoral (TNF), em conjunto com o processo de clivagem e ativação da caspase-8, que é uma caspase iniciadora (Hilbe et al., 2012). A outra via é a intrínseca,

também conhecida como mitocondrial-dependente, é regulada pela liberação de citocromo C pela mitocôndria no citosol. Posteriormente tem-se a produção do fator de ativação de apoptose 1 (Apaf-1), culminando na clivagem e ativação da caspase- 9, que também é uma caspase iniciadora (Li et al., 1997; Pedrera et al., 2012). Ambas as vias levam a ativação das caspases efetoras, sendo a principal a caspase-3. A presença de caspase-3 representa um estágio sem volta, sendo a morte celular irreversível (Pedrera et al., 2009).

Esta acentuada depleção de linfócitos, decorrente do processo de apoptose, induz à imunossupressão, tornando os animais mais susceptíveis a co-infecções causadas por bactérias, protozoários, e outros vírus (Megid et al., 2016). No período de 14 dias pós-infecção os animais desenvolvem imunidade, eliminam o vírus e recuperam-se totalmente (Hansen et al., 2010).

3.1.3.2. Infecção fetal

O BVDV ncp consegue atravessar a placenta bovina e estabelecer a infecção fetal (Smirnova et al., 2012). As consequências da infecção fetal dependem do período gestacional em que a vaca foi exposta ao BVDV. O feto pode desenvolver alterações em semanas ou meses após a infecção da mãe, ou ainda suportar a presença do vírus em seus tecidos e tornar-se imunotolerante ao agente. As consequências da infecção por BVDV em vacas durante o período gestacional estão demonstradas na Figura 2.

A infecção fetal no período de 29 a 41 dias de gestação pode resultar em morte embrionária e redução da taxa de prenhez (Lanyon et al., 2014). No primeiro trimestre gestacional, compreendendo o período de 40 a 120 dias, a infecção fetal pode resultar no desenvolvimento de animais PI (Zimmer et al., 2004). Neste período o sistema imune do bezerro ainda pode estar imaturo, ele reconhece o vírus como *self*. E desta forma, não desenvolve anticorpos contra o BVDV, tornando-se imunotolerante ao vírus.

No período de 80 a 150 dias de gestação, a infecção com o BVDV pode causar desenvolvimento de bezerros com malformações, como atrofia cerebelar, degeneração ocular, bragnatismo, hipotricose, formação de cistos em timo e ossos, além de desenvolvimento pulmonar retardado (Montgomery et al., 2008; Blanchard et al., 2010; Lanyon et al., 2014). Nesta fase também pode haver morte

fetal e abortamento.

A exposição ao BVDV após os 150 dias conduz a uma infecção transitória, que é eliminada tanto pela mãe como pelo feto, que neste estágio já tem capacidade de desenvolver resposta imune adaptativa contra o agente e debelar a infecção (Smirnova et al., 2012). Apesar de cada período gestacional de exposição ao BVDV ter suas determinadas consequências, o abortamento pode acontecer em qualquer fase, desde o terço inicial, até o terço final de gestação, dependendo do estado imunológico tanto da vaca como do feto (Lindberg, 2003).

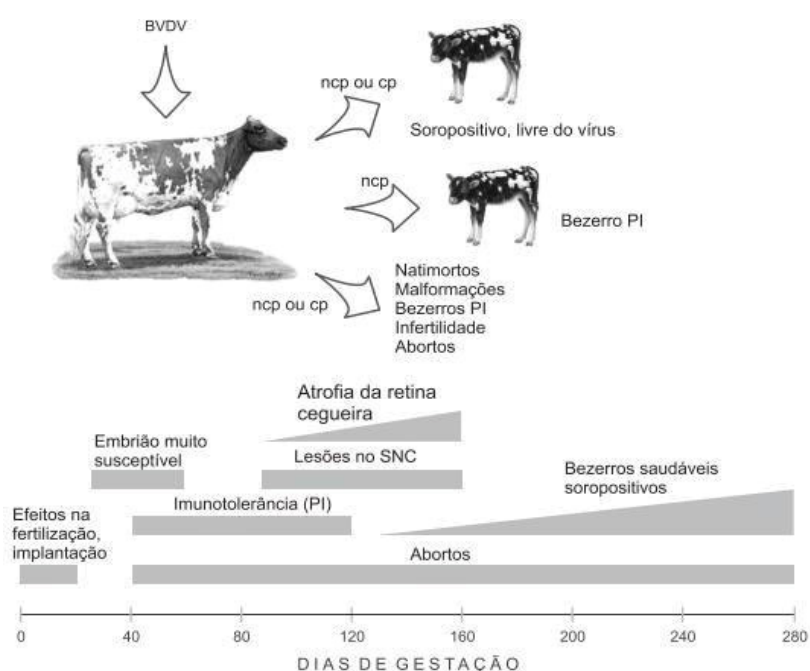


Figura 2. Adaptado de Ridpath; Flores et al. (2007). Consequências da infecção de fêmeas bovinas prenhes pelo BVDV, de acordo com o biótipo do vírus e com o estágio de gestação.

3.1.3.3. Persistentemente infectados

A exposição da vaca prenhe soronegativa ao BVDV, na fase inicial da gestação, entre 40 a 120 dias, pode dar origem a um bezerro persistentemente infectado (PI) (Brodersen, 2014). Esta infecção ocorre pelo biótipo ncp, anteriormente ao desenvolvimento da imunidade humoral do feto (Ridpath, 2010). O período de maior frequência é entre 30 a 90 dias, e ambos os genótipos do vírus (BVDV-1 e BVDV-2) podem causar a infecção persistente (Santos et al., 2011). Em virtude dessa incapacidade imunológica fetal, as proteínas

constituintes do vírus são de forma errônea reconhecidas como próprias do animal, tornando-o imunologicamente tolerante ao BVDV. E infectado persistentemente durante toda sua vida (Dubovi, 1994).

A patogênese da infecção persistente é complexa e envolve uma série de eventos que objetivam superar o sistema imune do hospedeiro (Schweizer et al., 2006). O sistema imune é formado por dois distintos mecanismos de defesa, sendo um o sistema imune inato e o outro o sistema imune adaptativo (Tizard, 2014).

O sistema imune inato caracteriza-se por sua pré-existência no hospedeiro, sem a necessidade de exposição a patógenos para seu desenvolvimento (Janeway Jr.; Medzhitov, 2002). É formado principalmente por barreiras físicas, químicas e biológicas, células fagocíticas, como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células *Natural Killer* (NK), além de moléculas quimiotáticas e citocinas (Dempsey; Cheng, 2003). O sistema imune adaptativo representa uma linha de defesa específica, formada após a exposição a um agente infeccioso, sendo composto por linfócitos B e T, células apresentadoras de antígenos e citocinas (Bonilla; Oettgen, 2010).

O reconhecimento dos patógenos é realizado por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que são expressos nas membranas plasmáticas de macrófagos e células dendríticas. Os receptores extracelulares para vírus são do tipo Toll-like (TLR), podendo ser das classes TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9, e fazem a detecção dos ácidos nucleicos virais (Iwasaki; Medzhitov, 2015). Os agentes infecciosos possuem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), estes se ligam aos PRRs, e induzem a resposta imune no organismo do hospedeiro. Esses padrões são estruturalmente distintos e incluem polissacarídeos complexos, glicolipídios, lipoproteínas, nucleotídeos e ácidos nucleicos (Peterhans; Schweizer, 2013).

As citocinas são proteínas responsáveis pela regulação da resposta imune por meio de sinalização celular. Os interferons representam uma classe de citocinas, sendo glicoproteínas sintetizadas em resposta às infecções virais (Tizard, 2014). Os interferons tipo 1 (IFN-1), categorizados em interferons α e β , são mecanismos imprescindíveis de defesa contra agentes virais. Eles são secretados por uma célula infectada e se ligam aos receptores de superfície das células para induzir um estado antiviral (Schweizer et al., 2006).

O BVDV ncp utiliza duas estratégias para estabelecimento da infecção persistente. A primeira é por meio do bloqueio da síntese de IFN-1. A glicoproteína E^{ns} do BVDV atua como uma RNase, tem a capacidade de degradar o RNA extracelular. A detecção de RNA extracelular é o gatilho para a síntese do IFN-1, com a degradação do RNA não há sinalização para indução do IFN-1 (Brodersen, 2014; Smirnova et al., 2014).

A segunda estratégia é por meio da evasão da seleção de linfócitos. Como a infecção se dá num período em que o feto ainda está no processo de desenvolvimento da resposta imune adaptativa, período de seleção e recrutamento de linfócitos, o vírus invade o sistema imune, e passa a ser reconhecido como próprio do organismo hospedeiro (Peterhans et al., 2003).

A infecção persistente pode apresentar-se de três formas; bezerros com nascimento e crescimento normal, bezerros fracos, pequenos, que morrem logo após o nascimento, ou bezerros aparentemente saudáveis, mas que morrem antes dos dois anos de idades (Khodakaram-Tafti; Farjanikish, 2017).

De todas as formas, a primeira é epidemiologicamente a mais preocupante, pela dificuldade de identificação destes animais e consequente permanência deles no rebanho disseminando o BVDV. Os animais que nascem prematuros, letárgicos, geralmente apresentam alguma má formação congênita, como hipoplasia cerebelar, catarata, degeneração da retina, bragnatismo e alopecia (Baker, 1995). Os animais que apresentam crescimento deficiente, e são visivelmente refugos no rebanho geralmente cursam com infecções intercorrentes (Rebhun, 2000). A resposta imune nestes animais pode ser frequentemente deficiente, apresentando redução da função linfocitária e neutrofílica, possuindo consequentemente baixa resistência a outras enfermidades. Por esta característica são tipicamente acometidos por infecções bacterianas, parasitárias e fúngicas (Dias et al., 2010).

Raramente o animal PI pode sobreviver e chegar à fase reprodutiva, porém, caso isso ocorra, sua prole sempre será persistentemente infectada com o BVDV, e dificilmente sobrevive (Khodakaram-Tafti; Farjanikish, 2017).

3.1.3.4. Infecção pós-natal

A susceptibilidade do bezerro à infecção pós-natal com BVDV está diretamente relacionada com o sucesso ou falha da transferência de imunidade passiva via ingestão do colostro materno (Goyal; Ridpath, 2005). Em caso de falha no aproveitamento do colostro o neonato exposto ao BVDV poderá desenvolver sinais da infecção aguda, sendo estes relacionados à imunossupressão, que contribui para o desenvolvimento de doenças multifatoriais no trato respiratório e gastrointestinal (Kelling; Topliff, 2013).

A infecção aguda possui variabilidade de gravidade, sendo que em sua maioria apresenta-se inaparente ou com sinais clínicos brandos. O animal pode apresentar aumento da temperatura corporal, presença de descarga nasal e leucopenia transitória (Pedrera et al., 2009). De acordo com Quadros et al. (2016) em seu estudo com infecção experimental de bezerros com cepa de BVDV-1 ncp, os animais apresentaram viremia dentro de um período de até oito dias pós infecção, com apresentação de sinais de hipertermia e descarga nasal e ocular. Em 14 dias pós-infecção os animais apresentaram soroconversão, debelando a infecção.

3.1.3.5. Doença das mucosas

Esta forma da doença se desenvolve em animais persistentemente infectados com o BVDV ncp, que em algum momento são expostos ao BVDV cp, ou sofrem mutação originando o BVDV cp (Lanyon et al., 2014). O BVDV expressa a protease NS3. E a presença dessa enzima juntamente com a dupla fita de RNA presente no processo de replicação viral, são responsáveis pela indução da apoptose pelas vias extrínseca e intrínseca (Yamane et al., 2005; Gamlen et al., 2010).

As alterações resultantes do processo de apoptose iniciam no intestino, com comprometimento dos tecidos linfoides, há acúmulo de restos celulares sobre as criptas, dando ao epitélio aparência de necrose. Com a destruição das vilosidades intestinais há maior liberação de fluído, resultando em diarreia e desidratação (Lanyon et al., 2014). Também há necrose de queratinócitos

presentes na pele, focinho, cavidade oral, esôfago, rúmen, retículo e omaso (Hilbe et al., 2012; Bianchi et al., 2016). Este processo necrótico faz com que as junções que ligam estas células sejam rompidas, expondo o epitélio e levando à ulceração (Bieleldt-Ohmann, 1995). A exposição destes tecidos inflamados, associada à infecção bacteriana, pode levar à septicemia (Lanyon et al., 2014).

3.1.4. PATOLOGIA

A forma fatal da infecção pelo BVDV é a doença das mucosas, apresentando taxa de letalidade de 100% (Flores, 2017). Diversos sistemas orgânicos podem ser invadidos e acometidos pelo vírus, entre esses o sistema gastrointestinal, cardiorrespiratório, imune e reprodutivo (Baker, 1995).

No exame pós-mortem, macroscopicamente, podem-se observar lesões erosivas e ulcerativas no trato gastrointestinal, evidentes em mucosa oral, epitélio da língua, esôfago e abomaso (Lunardi et al., 2008). Na avaliação histopatológica, tais lesões no TGI superior evidenciam-se como processos inflamatórios e necróticos, que podem apresentar-se com distribuição focal ou multifocal, sendo estes caracterizados, principalmente, por glossite proliferativa e esofagite ulcerativa (Hessman et al., 2012).

Por meio de inoculação da cepa citopática de BVDV-1 em bezerros PI para observação do desenvolvimento da doença das mucosas, constatou-se presença de erosões e úlceras em mucosa abomasal. Histologicamente evidenciaram-se erosões na mucosa do abomaso com presença de neutrófilos degenerados e células mononucleares. Também foi observado infiltrado de células linfoplasmocitárias em região fúndica glandular (Kim et al., 2016).

Em estudo realizado nos EUA com infecção experimental pós-natal em bezerros de seis meses de idade, foi observada na região do cólon proximal a presença de edema e hiperemia de mucosa (Wilhelmsen et al., 1990). Em outros relatos de animais positivos para o BVDV foram descritas lesões histológicas também em cólon. Estas lesões foram caracterizadas por necrose de células epiteliais das criptas, e presença de neutrófilos degenerados e debris celulares no interior das criptas (abscesso de cripta).

Em relação ao sistema imune, as principais alterações observadas são depleção dos tecidos linfoides e atrofia folicular. Esta depleção pode ser vista em

timo, linfonodos e baço, sendo mais evidente em infecções agudas, e principalmente em animais PI (Duncan et al., 2008; Falkenberg et al., 2017). No coração, raramente, podem ser observadas estrias esbranquiçadas, e presença de líquido no saco pericárdico. Enquanto que, na histologia pode-se evidenciar miocardite não supurativa e fibrose em torno das fibras de Purkinje e vasos sanguíneos (Pinto et al., 2013).

Ainda se discute quanto ao envolvimento do BVDV como causa primária de doença respiratória em bovinos, no entanto, é indiscutível que seu caráter imunossupressor predispõem a pneumonias bacterianas secundárias (Ridpath, 2010).

Na infecção congênita podem ser observadas lesões em sistema nervoso e olhos. Em sistema nervoso as alterações congênitas resumem-se a hidranencefalia, porencefalia, hidrocefalia, microcefalia e hipoplasia cerebelar, sendo esta última a de maior incidência (Agerholm et al., 2015). Na avaliação histopatológica a hipoplasia cerebelar caracteriza-se pela redução da quantidade de células de Purkinje, formação de cavidade irregular no cerebelo, evidenciando a rarefação tecidual, além de áreas de fibrose e infiltrado de células linfocitárias (Tunca et al, 2006; Gul et al., 2013). As lesões oculares descritas em animais infectados congenitamente são catarata, atrofia de retina, neurite óptica e microftalmia com displasia da retina (Aroch et al., 2008; Bistner et al., 1970).

3.1.5. SINAIS CLÍNICOS

A diarreia viral bovina possui diversas possibilidades de apresentação clínica, sendo que estas dependem de fatores como idade do animal, cepa viral, dose infectante, estado imunológico do indivíduo e do rebanho, genótipo e biótipo do BVDV, bem como exposição prévia ao agente de forma natural ou por vacinação e se há a presença de bovinos persistentemente infectados no rebanho (Dezen et al., 2013).

A maioria das infecções pelo BVDV é assintomática (Mascitti et al., 2017), no entanto, quando ocorre infecção por uma cepa citopática há a manifestação da enfermidade descrita como doença das mucosas (Baker, 1995). Neste caso podem ser vistas erosões no trato gastrointestinal, depressão, redução no apetite

e queda na produção de leite (Flores, 2017).

A forma aguda apresenta um período de incubação de dez a 14 dias após a exposição ao agente. Dependendo do estado imunológico do animal, os sinais clínicos poderão ser brandos ou graves. Podem ser observados sinais de febre, leucopenia transitória com linfopenia e trombocitopenia, diarreia e imunossupressão. A febre tem característica bifásica, começando alta (40,5 a 42°C) e diminuindo em alguns dias, para depois retornar após 5 a 10 dias (Rebhun, 2000). A hipertermia pode levar o animal a quadros de taquipneia, na tentativa de perder calor e restabelecer a temperatura corporal. Mesmo na forma aguda podem ser vistas lesões nas mucosas do TGI, como lesões erosivas macroscópicas, predominantemente, nas mucosas dos lábios, da língua, do esôfago e do rúmen (Lunardi et al., 2008).

Além da infecção fetal, o BVDV pode causar consequências reprodutivas aos animais infectados, sendo os abortamentos a maior causa de prejuízo. O aborto pode ocorrer em todos os períodos da gestação, e a mumificação fetal também é possível (Dezen et al., 2013). Outra preocupação é quanto à existência de touros imunocompetentes no estágio agudo da infecção ou persistentemente infectados, pois ambos eliminam o vírus no sêmen (Lindberg, 2003). Também pode haver infecção por meio da inseminação artificial, neste caso as vacas podem apresentar insuficiência reprodutiva, baixas taxas de prenhez, e altas taxas de retorno ao estro (Fray et al., 2000).

3.1.6. DIAGNÓSTICO

Com base no histórico clínico e reprodutivo, como abortamentos, perdas embrionárias, nascimento de bezerros fracos, malformações fetais, natimortos, é possível suspeitar de presença do BVDV no rebanho (Fray et al., 2000), além da presença dos sinais clínicos descritos. Quando nota-se a presença de bezerros fracos que apresentam constantes infecções intercorrentes, estes devem ser considerados suspeitos de serem animais persistentemente infectados com o BVDV (Dias et al., 2010).

Os testes diagnósticos mais utilizados são os sorológicos, incluindo ELISA direto para detecção de proteínas virais no soro dos animais amostrados. Este teste é utilizado para identificação de animais PI, justamente porque os mesmos

não apresentam anticorpos contra o BVDV, por isso é necessária a detecção do agente.

O ELISA indireto é usado para a detecção de anticorpos e a soroconversão neste caso indica apenas a exposição ao agente (Flores, 2017; Ridpath, 2010). Outros métodos como RT-PCR para detecção de RNA viral, isolamento em cultivo celular, seguido de imunofluorescência (IF) e imunoperoxidase (IPX) também podem ser utilizados para diagnóstico. Para a identificação dos animais PI, o isolamento viral seguido de detecção de antígenos no soro e/ou em biópsias de orelha por ELISA/IPX são os métodos de eleição (Flores, 2017).

3.1.7. CONTROLE E ERRADICAÇÃO

A estratégia utilizada atualmente para prevenção da doença é a vacinação. No entanto, este método tem se apresentado falho. De acordo com Otonel et al. (2014), esta falha no protocolo vacinal pode ser atribuída à constituição incompleta das vacinas, que não contam com todos os subgenótipos. Em rebanhos abertos animais recém-adquiridos podem ser responsáveis pela introdução de outros subgenótipos do vírus, além de que a falha nestes rebanhos vacinados também pode ser atribuída à disseminação do BVDV a bovinos susceptíveis por animais PI transportando diferentes tipos de genótipos. Em estudo realizado por Stahl e Alenius (2012), foi relatada deficiência nos protocolos vacinais em países da Europa e com isso foram adotadas medidas eficazes para controle e erradicação da doença nestes países.

Estas medidas contam com três elementos principais, sendo estes biossegurança, para prevenir a introdução de animais infectados em rebanhos livres da doença, eliminação dos animais PI em rebanhos infectados, com o intuito de reduzir a circulação viral, e monitoramento contínuo dos rebanhos livres para detecção precoce de reinfecção (Lindberg; Alenius, 1999). No programa de erradicação alemão, foram identificados e removidos 40 mil animais PI entre os anos de 2010 e 2013 (Gethmann et al., 2015). O fluxograma do controle e erradicação do BVD na Alemanha está representado na figura 3.

Este sistema adotado tem apresentado sucesso no controle e erradicação da doença nestes países. Além disso, deve-se priorizar a quarentena de animais adquiridos e o desenvolvimento de vacinas contendo isolados de vários

subgenótipos do BVDV que contribuirá para melhor eficiência dos protocolos de vacinação (Otonel et al., 2014).

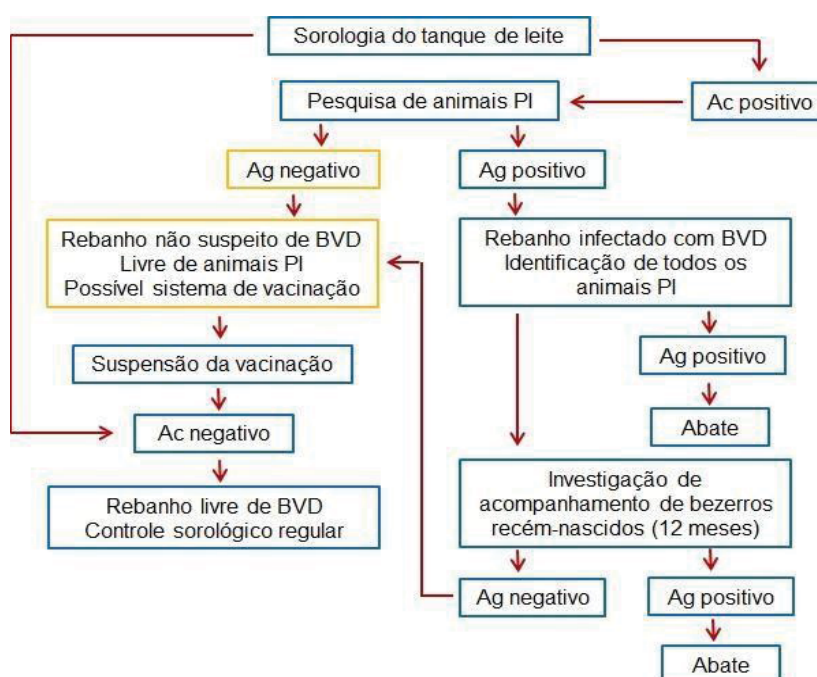


Figura 3. Adaptado de Moennig et al. (2005). Fluxograma representando estratégia de controle de BVD na Alemanha. A pesquisa de animais PI é essencial nesse processo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O BVDV é um vírus de grande importância econômica no setor de bovinocultura. Apesar de suas diversas formas clínicas da doença, ele apresenta baixa morbidade. Na epidemiologia do BVDV o animal persistentemente infectado merece destaque, sendo a principal forma de introdução e manutenção do vírus no rebanho. Este é o principal causador das perdas econômicas, visto que o mesmo, excreta grande quantidade de partículas virais em suas secreções e excreções. Quando se pensa em controle e prevenção da doença, deve-se atentar aos animais PI, pois a eliminação destes, associado ao período de quarenta na introdução de novos animais, e o monitoramento dos títulos de anticorpos no tanque de leite, é a chave para o controle da doença no rebanho.

REFERÊNCIAS

ALTAMIRANDA, E.A.G.; KAISER, G.G.; RÍOS, G.L.; LEUNDA, M.R.; ODEÓN, A.C. Interaction of bovine viral diarrhea virus with bovine cumulus–oocyte complex during IVM: Detection in permissive cells. **Theriogenology**, v.86, n.8, p.1999-2003, 2016.

ARENHART, S.; BAUERMANN, F.V.; OLIVEIRA, S.A.M.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Excreção e transmissão do vírus da diarreia viral bovina por bezerros persistentemente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.9, p.736-742, 2009.

AROCH, I.; OFRI, R.; SUTTON, G.A. Ocular Manifestations of Systemic Diseases. In: Maggs DJ, Miller PE, OFRI R. **Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology**, 4.ed. 2008. 374–418p.

BAKER, J.C. The manifestations of bovine viral diarrhea infection. **Veterinary Clinics North America: Food Animal Practice**, v.11, n.3, p.425-445, 1995.

BAKER, J.C. Clinical aspects of bovine virus diarrhoea virus infection. **Revue Scientifique et Technique International Office of Epizootics**, v.9, n.1, p.45-41, 1990.

BAUERMANN, F.V.; FALKENBERG, S.M.; VANDER LEY, B.; DECARO, N.; BRODERSEN, B.W.; HARMON, A.; HESSMAN, B.; FLORES, E.F.; RIDPATH, J.F. Generation of Calves Persistently Infected with HoBi-Like Pestivirus and Comparison of Methods for Detection of These Persistent Infections. **Journal Clinical Microbiology**, v.52, n.11, p.3845-3852, 2014.

BIANCHI, M. V.; KONRADT, G. DE SOUZA, S.O.; BASSUINO, D. M.; SILVEIRA, S.; MÓSENA, A. C.S.; CANAL, C. W.; PAVARINI, S. P. DRIEMEIER, D. Natural Outbreak of BVDV-1d-Induced Mucosal Disease Lacking Intestinal Lesions. **Veterinary Pathology**, v. 54, n. 2, p. 242–248, 2016.

BIELANSKI, A.; HARE, W.C.D. Effect *in vitro* of bovine viral diarrhea virus on bovine embryos with the zona pellucida intact, damaged and removed. **Veterinary Research Communications**, v.12, n.1, p.19-24, 1988.

BIELEFELDT-OHMANN, H. The pathologies of bovine viral diarrhea virus infection. **Veterinary Clinics North America: Food Animal Practice**, v.11, n.3, p.447-476, 1995.

BISTNER, S.I.; RUBIN, L.F.; SAUNDERS, L.Z. The ocular lesions of bovine viral diarrhea-mucosal disease. **Veterinary Pathology**, v.7, p.275-286, 1970.

BLANCHARD, P.C.; RIDPATH, J.F.; WALKER, J.B.; HIETALA, S.K. An outbreak of late-term abortions, premature births, and congenital deformities associated with a Bovine viral diarrhea virus 1 subtype b that induces thrombocytopenia. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v.22, n.1, p.128-131, 2010.

BONILLA, F.A.; OETTGEN, H.C. Adaptive immunity. **Journal Allergy and Clinical Immunology**, v.125, n.2, p.33-40, 2010.

BRODERSEN, B.W. Bovine Viral Diarrhea Virus Infections: Manifestations of Infection and Recent Advances in Understanding Pathogenesis and Control. **Veterinary Pathology**, v.51, n.2, p.453-464, 2014.

BRODGEN, K.A.; GUTHMILLER, J.M. **Polymicrobial Disease**. Washington (DC): ASM Press, 450, 2002.

CARMAN, S.; VAN DREUMEL, T.; RIDPATH, J.; HAZLETT, M.; ALVES, D.; DUBOVI, E.; TREMBLAY, R.; BOLIN, S.; GODKIN, A.; ANDERSON, N. Severe acute bovine viral diarrhea in Ontario, 1993–1995. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v.10, n.1, p.27-35, 1998.

CHILDS, T. X Disease of Cattle – Saskatchewan. **Canadian Journal Comparative Medicine and Veterinary Science**, v.10, n.11, p.316-319, 1946.

COLLET, M.S.; LARSON, R.; GOLD, C.; STRICK, D.; ANDERSON, D.K.; PURCHIO, A.F. Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of the Pestivirus Bovine Viral Diarrhea Virus. **Virology**, v. 165, n.1, p.191-199, 1988.

CORTEZ, A.; HEINEMANN, M.B.; CASTRO, A.M.M.G.; SOARES, R.M.; PINTO, A.M.V.; ALFIERI, A.A.; FLORES, E.F.; LEITE, R.C.; RICHTZENHAIN, L.J. Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5'-UTR region. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.26, n.4, p.211-216, 2006.

DEAN, H.J.; HUNSAKER, B.D.; BAILEY, D.; WASMOEN, T. Prevention of persistent infection in calves by vaccination of dams with noncytopathic type-1 modified-live bovine viral diarrhea virus prior to breeding. **American Journal Veterinary Research**, v.64, n.5, p.530-537, 2003.

DEMPSEY, P.W.; CHENG, V.G. The Art of War: Innate and adaptive immune responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.60, n.12, p.2604-2621, 2003.

DEZEN, S.; OTONEL, R.A.A.; ALFIERI, A.F.; LUNARDI, M.; ALFIERI, A.A. Perfil da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em um rebanho bovino leiteiro de alta produção e com programa de vacinação contra o BVDV. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 2, p. 141–147, 2013.

DIAS, F. C.; MÉDICI, K.C.; ALEXANDRINO, B.; MEDEIROS, A.S.R.; ALFIERI, A.A.; SAMARA, S.I. Ocorrência de animais persistentemente infectados pelo vírus da diarreia viral bovina em rebanhos bovinos nos estados de minas gerais e São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 11, p. 933–939, 2010.

DIAS, F.C.; SAMARA, S.I. Detecção de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina no soro sanguíneo, no leite individual e no leite de conjunto em tanque de expansão de rebanhos não vacinados. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v.40, n.3, p.161-168, 2003.

DUBOVI, E. J. Impacto of bovine diarrhea virus on reproductive performance in cattle. Veterinary Clinic of North America: Food Animal Practice. **Veterinary Clinics North America: Food Animal Practice**, v. 10, p. 503–514, 1994.

DUONG, M. C. et al. Prevalence of Neospora caninum and bovine viral diarrhoea virus in dairy cows in Southern Vietnam. **The Veterinary Journal**, v. 175, n. 3, p. 390–394, 2008.

DUNCAN, C.; RIDPATH, J.; PALMER, M.V.; RISKELL, E.; SPRAKER, T. Histopathologic and Immunohistochemical Findings in Two White-Tailed Deer Fawns Persistently Infected with Bovine Viral Diarrhea Virus. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, n. 3, p. 289–296, 2008.

FALKENBERG, S. M.; BAUERMANN, F. V.; RIDPATH, J. F. Characterization of thymus-associated lymphoid depletion in bovine calves acutely or persistently infected with bovine viral diarrhoea virus 1, bovine viral diarrhoea virus 2 or HoBi-like pestivirus. **Archives Virology**, v. 162, n. 11, p. 3473–3480, 2017.

FINO, T. C. M. et al. Diarréia bovina a vírus (bvd) - uma breve revisão. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 34, n. 2, p. 131–140, 2012.

FLORES, E.F. **Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**. Santa Maria: UFSM, 1136p, 2017.

FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F.S.F.; ROEHE, P.M.; ALFIERI, A.A.; PITUCO, E.M. A infecção pelo vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) no Brasil - histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, p. 125–134, 2005.

FRAY, M. D.; PATON, D.; ALENIUS, S. The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 615–627, 2000.

FRAY, M.D.; PRENTICE, H.; CLARKE, M.C.; CHARLESTON, B. Immunohistochemical evidence for the localization of bovine viral diarrhoea virus, a single stranded RNA virus, in ovarian oocytes in the cow. **Veterinary Pathology**, v.35, p.253-259, 1998.

FULTON, R. W. HESSMAN, B.; JOHNSON, B.J.; RIDPATH, J.F.; SALIKI, J.T.; BURGE, L.J.; SJELOCHA, D.; CONFER, A.W.; FUNK, R.A.; PAYTON, M.E. Evaluation of diagnostic tests used for detection of bovine viral diarrhoea virus and prevalence of subtypes 1a, 1b, and 2a in persistently infected cattle entering a feedlot. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 228, n. 4, p. 578–584, 2006.

GAMLEN, T.; RICHARDS, K.H.; MANKOURI, J.; HUDSON, L.; MCCAULEY, J.; HARRIS, M.; MACDONALD, A. Expression of the NS3 protease of cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus results in the induction of apoptosis but does not block activation of the beta interferon promoter. **Journal General Virology**, v.91, n.1, p.133-144, 2010.

GETHMANN, J.; HOMEIER, T.; HOLSTEG, M.; SCHIRRMIEIER, H.; SABERATH, M.; HOFFMANN, B.; BEER, M.; CONRATHS, F.J. BVD-2 outbreak leads to high losses in cattle farms in Western Germany. **Heliyon**, v.1, n.1, 2015.

GIAMMARIOLI, M.; CEGLIE, L.; ROSSI, E.; BAZZUCCHI, M.; CASCIARI, C.; PETRINI, S.; DE MIA, G.M. Increased genetic diversity of BVDV-1: recent findings and implications thereof. **Virus Genes**, v. 50, n.1, p. 147–151, 2015.

GIVENS, M.D.; HEATH, A.M.; BROCK, K.V.; BRODERSEN, B.W.; CARSON, R.L.; STRINGFELLOW, D.A. Detection of bovine viral diarrhea virus in semen obtained after inoculation of seronegative postpubertal bulls. **American Journal Veterinary Research**, v.64, n.4, p.428-434, 2003.

GLEW, E.J.; CARR, B.V.; BRACKENBURY, L.S.; HOPE, J.C.; CHARLESTON, B.; HOWARD, C.J. Differential effects of bovine viral diarrhoea virus on monocytes and dendritic cells. **Journal General Virology**, v.84, n.7, p.1771-1780, 2003.

GOYAL, S.M.; RIDPATH, J.F. **Bovine viral diarrhea virus: diagnosis, management, and control**. 1.ed. Ames:Blackwell Publishing, 2005.

GROOMS, D. L. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhea virus and leptospirosis. **Theriogenology**, v.66, n.3, p.624–628, 2006.

GROOMS, D.L. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Clinics North America: Food Animal Practice**, v.10, n.1, p.5-19, 2004.

GROOMS, D.L.; BROCK, K.V.; WARD, L.A. Detection of cytopathic bovine viral diarrhea virus in the ovaries of cattle following immunization with a modified live bovine viral diarrhea virus vaccine. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v.10, n.2, p.130-134, 1998.

GUARINO, H.; NÚÑES, A.; REPISO, M.V.; GIL, A.; DARGATZ, D.A. Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhea virus in beef cattle in Uruguay. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 85, p. 34–40, 2008.

GUL, Y.; ISSI, M.; CEVIK, A.; GURCAY, M.; BAYDAR, E.; EROKSUZ, H. Case report: cerebellar hypoplasia associated with bovine viral diarrhoea (BVD) virus infection in a calf , in Turkey. **Revue Médecine Vétérinaire**, v. 164, n. 10, p. 448–452, 2013.

HANSEN, T.R.; SMIRNOVA, N.P.; VAN CAMPEN, H.; SHOEMAKER, M.L.; PTISYN, A.A. Maternal and Fetal Response to Fetal Persistent Infection with Bovine Viral Diarrhea Virus. **American Journal Reproductive Immunology**, v. 64, n.4., p.295-306, 2010.

HESSMAN, B.E.; FULTON, R.W.; SJEKLOCHA, D.B.; MURPHY, T.A.; RIDPATH, J.F.; PAYTON, M.E. Evaluation of economic effects and the health and performance of the general cattle population after exposure to cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus in a starter feedlot. **American Journal Veterinary Research**, v.70, n.1, p.73-85, 2009.

HESSMAN, B. E.; SJEKLOCHA, D.B.; FULTON, R.W.; RIDPATH, J.F.; JOHNSON, B.J.; MCELROY, D.R. Acute bovine viral diarrhea associated with extensive mucosal lesions, high morbidity, and mortality in a commercial feedlot. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n. 2, p. 397–404, 2012.

HEUER, C.; HEALY, A.; ZERBINI, C. Economic Effects of Exposure to Bovine Viral Diarrhea Virus on Dairy Herds in New Zealand. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 12, p. 5428–5438, 2007.

HILBE, M.; GIRAO, V.; BACHOFEN, C.; SCHWEIZER, M.; ZLINSZKY, K.; EHRENSPERGER, F. Apoptosis in Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV)–Induced Mucosal Disease Lesions: A Histological, Immunohistological, and Virological Investigation. **Veterinary Pathology**, v.50, n.1, p.46-55, 2012.

HOUE, H. Epidemiology of Bovine Viral Diarrhea Virus. **Veterinary Clinics North America: Food Animal Practice**, v.11, n.3, p.521-547, 1995.

IBGE - **Produção da Pecuária municipal 2016**. Rio de Janeiro: IBGE, 2017.

ICVT

IQBAL, M.; FLICK-SMITH, H.; MCCAULEY, J.W. Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein Erns with cell surface glycosaminoglycans. **Journal General Virology**, v.81, n.2, p.451-459, 2000.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nature Immunology**, v.16, n.4, p.343-353, 2015.

JANEWAY JR., C.A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review Immunology**, v.20, n.1, p.197-216, 2002.

KELLING, C.L.; TOPLIFF, C.L. Bovine maternal, fetal and neonatal responses to bovine viral diarrhoea virus infections. **Biologicals**, v.41, n.1, p.20-25, 2013.

KELLING, C.L. Evolution of bovine viral diarrhoea virus vaccines. **Veterinary Clinics North America: Food Animal Practice**, v.20, n.1, p.115-129, 2004.

KHODAKARAM-TAFTI, A.; FARJANIKISH, G.H. Persistent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in cattle herds. **Iranian Journal Veterinary Research**, v.18, n.3, p.154-163, 2017.

KIM, H.Y.; BAK, E.J.; KIM, J.J.; WOO, G.H. Experimental superinfection of bovine viral diarrhoea virus in persistently infected korean native calves. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 36, n. 3, p. 338–343, 2016.

KIRKLAND, P.D.; RICHARDS, S.G.; ROTHWELL, J.T.; STANLEY, D.F. Replication of bovine viral diarrhoea virus in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections. **Veterinary Record**, v.128, n.25, p.587- 590, 1991.

KREY, T.; HIMMELREICH, A.; HEIMANN, M.; MENGE, C.; THIEL, H.J.; MAURER, K.; RÜMENAPF, T. Function of Bovine CD46 as a Cellular Receptor for Bovine Viral Diarrhoea Virus Is Determined by Complement Control Protein 1. **Journal of Virology**, v.80, n.8, p.3912-3922, 2006.

LANYON, S.R.; HILL, F.I.; REICHEL, M.P.; BROWNLIE, J. Bovine viral diarrhoea:

Pathogenesis and diagnosis. **The Veterinary Journal**, v.199, n.2, p.201-209, 2014.

LAUREYNS, J.; PIEPERS, S.; RIBBENS, S.; SARRAZIN, S.; VLIEGHER, S.; VAN CROMBRUGGE, JM.; DEWULF, J. Association between herd exposure to BVDV-infection and bulk milk somatic cell count of Flemish dairy farms. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 109, n. 1–2, p. 148–151, 2013.

LECOT, S.; BELOUZARD, S.; DUBUISSON, J.; ROUILLÉ, Y. Bovine Viral Diarrhea Virus Entry Is Dependent on Clathrin-Mediated. **Journal Virology**, v.79, n.16, p.10.826-10.829, 2005.

LEE, D. H.; PARK, S.W.; CHOI, E.W.; LEE, C.W. Investigation of the prevalence of bovine viral diarrhoea virus in dairy cows in South Korea. **Veterinary Record**, v. 162, p. 211–213, 2008.

LIEBLER-TENORIO, E.M.; RIDPATH, J.F.; NEILL, J.D. Lesions and tissue distribution of viral antigen in severe acute versus subclinical acute infection with BVDV2. **Biologicals**, v.31, n.2, p.119-122, 2003.

LIEBLER-TENORIO, E.M.; GREISER-WILKE, I.; POHLENZ, J.F. Organ and tissue distribution of the antigen of the cytopathogenic bovine virus diarrhoea virus in the early and advanced phase of experimental mucosal disease. **Archives Virology**, v.141, n.8, p.1613-1634, 1997.

LIEBLER, E.M.; WASCHBÜSCH, J.; POHLENZ, J.F.; MOENNIG, V.; LIESS, B. Distribution of antigen of noncytopathogenic and cytopathogenic bovine virus diarrhoea virus biotypes in the intestinal tract of calves following experimental production of mucosal disease. **Archives Virology**, v.3, p.109-124, 1991.

LIESS, B. Bovine Viral Diarrhoea Virus. In: Dinter Z, Morein B. **Virus Infections of Ruminantes**. 1.ed. Elsevier Science Ltd. 1990. 247-266p.

LI, P.; NIJHAWAN, D.; BUDIHARDJO, I.; SRINIVASULA, S.M.; AHMAD, M.; ALNEMRI, E.S.; WANG, X. Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. **Cell**, v.91, n.4, p.479-489, 1997.

LINDBERG, A.L.E. Bovine viral Diarrhoea virus infections and its control: A review. **Veterinary Quarterly**, v.25, n.1, p.1-16, 2003.

LINDBERG, A. L.; ALENIUS, S. Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. **Veterinary Microbiology**, v. 64, p. 197–222, 1999.

LUNARDI, M.; HEADLEY, S.A.; LISBÔA, J.A.N.; AMUDE, A.M.; ALFIERI, A.A. Outbreak of acute bovine viral diarrhoea in Brazilian beef cattle: Clinicopathological findings and molecular characterization of a wild-type BVDV strain subtype 1b. **Research Veterinary Science**, v. 85, n.3, p.599-604, 2008.

MASCITTI, A.K.; FRAGA, A.P.; ABREU, J.P.R; WEBER, M.N.; SALLA, P.F.; CORRÊA, M.V.S.; IKUTA, N.; CANAL, C.W.; LUNGE, V.R. Pesquisa do vírus da

diarreia viral bovina em touros mantidos a campo no estado do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.69, n.3, p.766-770, 2017.

MAURER, K.; KREY, T.; MOENNIG, V.; THIEL, H.J.; RÜMENAPF, T. CD46 Is a Cellular Receptor for Bovine Viral Diarrhea Virus. **Journal Virology**, v.78, n.4, p.1792-1799, 2004.

MEDGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. **Doenças Infecciosas em animais de produção e de companhia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016.

MEYLING, A.; HOUE, H.; JENSEN, A.M. Epidemiology of bovine virus diarrhea virus. **Revue Scientifique et Technique International Office of Epizootics**, v.9, n.1, p.75- 93, 1990.

MOENNIG, V.; HOUE, H.; LINDBERG, A. BVD control in Europe: current status and perspectives. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, n. 1, p. 63–74, 2005.

MONTGOMERY, D.L.; VAN OLPHEN, A.; VAN CAMPEN, H.; HANSEN, T.R. The Fetal Brain in Bovine Viral Diarrhea Virus-infected Calves: Lesions, Distribution, and Cellular Heterogeneity of Viral Antigen at 190 Days Gestation. **Veterinary Pathology**, v.45, n.3, p.288-296, 2008.

NELSON, G.; MARCONI, P.; PERIOLO, O.; LA TORRE, J.; ALVAREZ, M.A. Immunocompetent truncated E2 glycoprotein of bovine viral diarrhea virus (BVDV) expressed in Nicotiana tabacum plants: A candidate antigen for new generation of veterinary vaccines. **Vaccine**, v. 30, n. 30, p. 4499–4504, 2012.

NISKANEN, R.; LINDBERG, A. Transmission of Bovine Viral Diarrhoea Virus by Unhygienic Vaccination Procedures, Ambient Air, and from Contaminated Pens. **Veterinary Journal**, v.165, n.2, p.125-130, 2003.

OLAFSON, P.; MACCALLUM, A.D.; FOX, F.H. An apparently new transmissible disease of cattle. **Cornell veterinarian**, v.36, p. 205-213, 1946.

OTONEL, R. A. A.; ALFIERI, A.F.; DEZEN, S.; LUNARDI, M.; HEADLEY, S.A.; ALFIERI, A.A. The diversity of BVDV subgenotypes in a vaccinated dairy cattle herd in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, n. 1, p. 87–92, 2014.

PALMER, M.V.; STASKO, J.; WATERS, W.R.; THACKER, T.C. Examination of the Reticular Epithelium of the Bovine Pharyngeal Tonsil. **Anatomical Record**, v.294, n.1, p.1939-1950, 2011.

PASSLER T.; WALZ, P.H. Bovine viral diarrhea virus infections in heterologous species. **Animal Health Research Reviews**, v.11, n.2, p.191-205, 2010.

PEDRERA, M.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J.C.; RISALDE, M.A.; MOLINA, V.; SÁNCHEZ-CORDÓN, P.J. Characterization of Apoptosis Pathways (Intrinsic and Extrinsic) in Lymphoid Tissues Of Calves Inoculated with Non-cytopathic Bovine Viral Diarrhoea Virus Genotype-1. **Journal Comparative Pathology**, v.146, n.1, p.30-39,

2012.

PEDRERA, M.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J.C.; ROMERO-TREVEJO, J.L.; RISALDE, M.A.; MOLINA, V.; SÁNCHEZ-CÓRDON, P.J. Apoptosis in lymphoid tissues of calves inoculated with non-cytopathic bovine viral diarrhea virus genotype 1: activation of effector caspase-3 and role of macrophages. **Journal General Virology**, v.90, n.11, p.2650-2659, 2009.

PETERHANS, E.; SCHWEIZER, M. BVDV: A pestivirus inducing tolerance of the innate immune response. **Biologicals**, v.41, n.1, p.39-51, 2013.

PETERHANS, E.; BACHOFEN, C.; STALDER, H.; SCHWEIZER, M. Cytopathic bovine viral diarrhea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. **Veterinary Research**, v.41, n.6, 2010.

PETERHANS, E.; JUNGI, T.W.; SCHWEIZER, M. BVDV and innate immunity. **Biologicals**, v.31, n.2, p.107-111, 2003.

POTGIETER, L.N.D. Immunology of bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Clinic North America: Food Animal Practice**, v.11, n.3, p.501-520, 1995.

QUADROS, L. M.; JARDIM, J.C.S.; MERCHIORATTO, I.; BRUM, M.C.S. Clinical and virological characteristics of calves experimentally infected with a Brazilian isolate of bovine viral diarrhea virus type 1a. **Ciência Rural**, v. 46, n. 11, p. 1986–1991, 2016.

QUINCOZES, C.G.; FISCHER, G.; HÜBNER, S.O.; VARGAS, G.D.A.; VIDOR, T.; BROD, C.S. Prevalência e fatores associados à infecção pelo vírus da diarreia viral bovina na região Sul do Rio Grande do Sul. **Semina: Ciências Agrárias**, v.28, n.2, p.269–276, 2007.

RADOSTITS, O.M.; LITTLEJOHNS, I.R. New Concepts in the Pathogenesis, Diagnosis and Control of Diseases Caused by the Bovine Viral Diarrhea Virus. **Canadian Veterinary Journal**, v.29, n.6, p.513-528, 1988.

REBHUN, W. C. **Doenças do gado leiteiro**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2000.

RIDPATH, J. F. Bovine Viral Diarrhea Virus: Global Status Veterinary. **Veterinary Clinic North America: Food Animal Practice**, v. 26, n.1, p. 105–121, 2010.

RIDPATH J.F.; FLORES E.F. Flaviviridae. IN: FLORES E.F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: UFSM, p.565-591, 2007.

SANTOS, R.L.; ALESSI, A.C. **Patologia Veterinária**. São Paulo: Roca, 2010, 892p.

SANTOS, A.S; ANTONIASSI, N.A.B.; BOABAID, F.M.; BITENCOURT, A.P.G.; ALMEIDA, L.L.; CANAL, C.W.; FLORES, E.F.; DRIEMEIER, D. Aspectos clínicos, patológicos, imuno-histoquímicos e virológicos em cinco bezerros persistentemente infectados com o vírus da diarreia viral bovina em uma propriedade do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.10, p.885-892, 2011.

SCHUH, J.C.L.; OLIPHANT, L.W. Development and Immunophenotyping of the

Pharyngeal Tonsil (Adenoid) in Cattle. **Journal Comparative Pathology**, v.106, p.229-241, 1992.

SCHWEIZER, M.; MÄTZENER, P.; PFAFFEN, G.; STALDER, H.; PETERHANS, E. "Self" and "Nonself" Manipulation of Interferon Defense during Persistent Infection: Bovine Viral Diarrhea Virus Resists Alpha/Beta Interferon without Blocking Antiviral Activity against Unrelated Viruses Replicating in Its Host Cells. **Journal Virology**, v.80, n.14, p.6926-6935, 2006.

SMIRNOVA, N.P.; WEBB, B.T.; MCGILL, J.L.; SCHAUT, R.G.; BIELEFELDT-OHMANN, H.; VAN CAMPEN, H.; SACCO, R.E.; HANSEN, T.R. Induction of interferon-gamma and downstream pathways during establishment of fetal persistent infection with bovine viral diarrhea virus. **Virus Research**, v.183, n.1, p.95-106, 2014.

SMITH, D. R.; GROTELUESCHEN, D. M. Biosecurity and biocontainment of bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 131–149, 2004.

SMIRNOVA, N.P.; WEBB, B.T.; BIELEFELDT-OHMANN, H.; VAN CAMPEN, H.; ANTONIAZZI, A.Q.; MORARIE, S.E.; HANSEN, T.R. Development of fetal and placental innate immune responses during establishment of persistent infection with bovine viral diarrhea virus. **Virus Research**, v.167, n.2; p.329-336, 2012.

SILVEIRA, S.; WEBER, M.N.; MÓSENA, A.C.S.; SILVA, M.S.; STRECK, A.F.; PESCADOR, C.A.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; DRIEMEIER, D.; RIDPATH, J.F.; CANAL, C.W. Genetic Diversity of Brazilian Bovine Pestiviruses Detected Between 1995 and 2014. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.64, n.2, p.613-623, 2015.

SOPP, P.; HOOPER, L.B.; CLARKE, M.C.; HOWARD, C.J.; BROWNLIE, J. Detection of bovine viral diarrhoea virus p80 protein in subpopulations of bovine leukocytes. **Journal General Virology**, v.75, p.1189-1194, 1994.

STAHL, K.; ALENIUS, S. BVDV control and eradication in Europe - an update. **Japanese Journal Veterinary Research**, v. 60, p. 31–39, 2012.

TALAFHA, A. Q.; HIRCHE, S.M.; ABABNEH, M.M.; AL-MAJALI, A.M.; ABABNEH, M.M. Prevalence and risk factors associated with bovine viral diarrhea virus infection in dairy herds in Jordan. **Tropical Animal Health and Production**, v. 41, n. 4, p. 499–506, 2009.

TAN, T. M.; KARAOGLU, M.T.; EROL, N.; YILDIRIM, Y. Serological and Virological Investigations of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) Infection in Dairy Cattle Herds in Aydin Province. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 30, p. 299–304, 2006.

THOMANN, B.; TSCHOPP, A.; MAGOURAS, I.; MEYLAN, M.; SCHÜPBACH-REGULA, G. Economic evaluation of the eradication program for bovine viral diarrhea in the Swiss dairy sector. **Preventive Veterinary Medicine**, v.145, p.1-6, 2017.

THULKE, H.H.; LANGE, M.; TRATALOS, J.A.; CLEGG, T.A.; MCGRATH, G.; O'GRADY, L.; O'SULLIVAN, P.; DOHERTY, M.L.; GRAHAM, D.A.; MORE, S.J. Eradicating BVD, reviewing Irish programme data and model predictions to support prospective decision making. **Preventive Veterinary Medicine**, v.150, p.151-161, 2017.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária**, 9^a ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. 568p.

TUNCA, R. et al. Congenital cerebellar hypoplasia associated with BVD-MD virus infection in a naturally infected calf - a case report. **Veterinarski Arhiv**, v. 76, n. 5, p. 453–460, 2006.

VILCEK, S.; DURKOVIC, B.; KOLESAROVA, M.; PATON, D. J. Genetic diversity of BVDV: Consequences for classification and molecular epidemiology. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, n. 1–2, p. 31–35, 2005.

VILCEK, S.; PATON, D.J.; DURKOVIC, B.; STROJNY, L.; IBATA, G.; MOUSSA, A.; LOITSCH, A.; ROSSMANITH, W.; VEGA, S.; SCICLUNA, M.T.; PALF, V. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. **Archives Virology**, v.146, n.1, p.99-115, 2001.

WERNIKE, K.; GETHMANN, J.; SCHIRRMIEIER, H.; SCHRÖDER, R.; CONRATHS, F.J.; BEER, M. Six Years (2011–2016) of Mandatory Nationwide Bovine Viral Diarrhea Control in Germany - A Success Story. **Pathogens**, v.6, n.4, 2017.

WILHELMSSEN, C. L.; BOLIN, S.R.; RIDPATH, J.F.; CHEVILLE, N.F.; KLUGE, J.P. Experimental primary postnatal bovine viral diarrhoea viral infections in six month old calves. **Veterinary Pathology**, v. 27, n. 4, p. 235–243, 1990.

XUE, F.; ZHU, Y.M.; LI, J.; ZHU, L.C.; REN, X.G.; FENG, J.K.; SHI, H.F.; GAO, Y.R. Genotyping of bovine viral diarrhoea viruses from cattle in China between 2005 and 2008. **Veterinary Microbiology**, v.143, n.2-4, p.379-383, 2010.

YAMANE, D.; NAGAI, M.; OGAWA, Y.; TOHYA, Y.; AKASHI, H. Enhancement of apoptosis via an extrinsic factor, TNF- α , in cells infected with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. **Microbes and Infection**, v.7, n.15, p.1482-1491, 2005.

YESILBAG, K.; FÖRSTER, C.; BANK-WOLF, B.; YILMAZ, Z.; ALKAN, F.; OZKUL, A.; BURGU, I.; ROSALES, S.C.; THIEL, H.J.; KÖNIG, M. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Turkey: Identification of a new subgroup in BVDV-1. **Veterinary microbiology**, v.130, n.3-4, p.258-267, 2008.

ZIMMER, G.M.; VAN MAANEN, C.; DE GOEY, I.; BRINKHOF, J.; WENTINK, G.H. The effect of maternal antibodies on the detection of bovine virus diarrhoea virus in peripheral blood samples. **Veterinary Microbiology**, v.100, n.3-4, p.145-149, 2004.

4. CAPÍTULO 2

Prevalência de bovinos persistentemente infectados com o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em rebanhos leiteiros no estado do Paraná, Brasil

Prevalence of bovines infected persistently with bovine viral diarrhea virus (BVDV) in dairy cattle herds in Paraná State, Brazil

Bárbara Barbi de Freitas

Resumo

Com o intuito de se estabelecer a prevalência de animais persistentemente infectados (PI) com o BVDV em propriedades leiteiras no estado do Paraná. Foram coletadas amostras de 6.465 bovinos, fêmeas, da raça Holandês Preto e Branco (HPB). Amostraram-se animais com idade inferior a dois anos, fêmeas com mais de dois anos que não haviam tido partos na propriedade, e mães de bezerros que foram diagnosticados como persistentemente infectados. Os bovinos foram provenientes de 40 rebanhos leiteiros, distribuídos em 10 municípios no Estado do Paraná. A coleta deu-se no período de maio de 2015 a agosto de 2018. O diagnóstico dos animais PI foi feito por meio do teste de ELISA de captura de antígeno. Animais PI foram detectados em quinze rebanhos amostrais (37,5%), oscilando entre um e dezesseis animais por rebanho. A prevalência nos municípios do estado Paraná foi de 1,78%, oscilando entre 0,3 a 8,9% nos rebanhos positivos. Com a alta prevalência de animais PI observada, quando analisados os rebanhos amostrais individualmente, é possível afirmar que há uma disseminação importante do BVDV em municípios paranaenses, destacando inclusive áreas endêmicas. Com isso, vê-se a necessidade de medidas de conscientização dos produtores sobre a existência e importância da BVD nos rebanhos, destacando o papel dos animais PI na epidemiologia da doença, bem como o impacto econômico causado pela manutenção desses animais nos rebanhos.

Palavras-chave: bovino leiteiro, diarreia viral bovina, infecção persistente.

Abstract

In order to establish the prevalence of persistently infected (PI) animals with BVDV in dairy farms at Parana State, Brazil. Samples were collected from 6,465 female, Holstein Friesian Dairy Cattle. Animals less than two years old were collected, females over two years old who had not had births at the farm, and mothers of calves that were diagnosed as persistently infected. The cattle came from 40 dairy herds, distributed in 10 municipalities in the State of Paraná. The samples were obtained from May 2015 to August 2018. The diagnosis Pi animals was made with antigen capture ELISA test. The animals were detected in fifteen herds sampled (37.5%), ranging from one to sixteen animals per herd. The prevalence in the municipalities of Parana State was 1.78%, ranging from 0.3 to 8.9% at positive herds. With high of observed PI animals, when the individual sampled herds were analyzed, it is possible to affirm that there is an important dissemination of the BVDV in municipalities of Parana, including endemic areas. With this, we see the need for measures to raise awareness among producers about the existence and importance of BVD at dairy herds, highlighting the role of PI animals in disease epidemiology, as well as the

economic impact caused by maintenance these animals at farms.

Key words: dairy cattle, viral diarrhea virus, persistent infection

Introdução

O vírus da diarréia viral bovina (BVDV) causa importante impacto econômico em rebanhos bovinos, sendo endêmico em vários países do mundo (Hessman et al., 2009; Hessman et al., 2012; Stahl e Alenius, 2012). O vírus causa perdas reprodutivas e produtivas como baixa produção de leite, abortos, mumificação fetal, nascimento de bezerros fracos, baixas taxas de concepção e aumento da mortalidade neonatal (Berends et al., 2008).

A diarréia viral bovina (BVD) possui diferentes apresentações clínicas, dependendo do genótipo, biótipo e virulência da cepa viral, bem como a suscetibilidade do hospedeiro (Moennig et al., 2005). Quando uma vaca prenhe soronegativa é infectada com o BVDV não citopático no primeiro trimestre da gestação, entre o período de 40 a 120 dias, pode resultar em morte fetal ou nascimento de bezerros persistentemente infectados (PI) (Grooms, 2004). Os animais PI não apresentam anticorpos contra o BVDV, porque o seu sistema imunológico reconhece o vírus como próprio (Arenhart et al., 2009). No entanto, estes animais eliminam grandes quantidades de vírus nas suas excreções e secreções ao longo de toda a vida, portanto, são responsáveis pela introdução e manutenção do vírus em rebanhos (Houe, 1995).

A maior dificuldade das propriedades é a identificação dos animais PI, uma vez que os mesmos podem se apresentar saudáveis e não levantar nenhuma suspeita da sua condição (Houe, 1993). Não há produção de anticorpos contra o BVDV, desta forma os testes sorológicos para identificá-los não são úteis (Stockstad; Loken, 2002). Para diagnosticar esses animais é necessária a detecção do vírus em amostras de sangue ou fragmentos de orelha, por meio de Imunoensaio Enzimático (ELISA) direto, isolamento do vírus, imunoperoxidase, imunofluorescência direta ou Reação em Cadeia da Polimerase precedida de Transcriptase Reversa (RT-PCR) (Flores, 2017). Para a avaliação do status viral no rebanho, amostras de tanques de leite podem ser coletadas periodicamente para determinação de títulos de anticorpos (Kramps et al., 1999). A detecção de altos títulos de anticorpos pode ser indicativa da presença de animais PI no rebanho (Houe, 2003; Niskanen et al., 1991).

A principal estratégia para o controle da doença nos rebanhos é a identificação e eliminação dos animais PI (Smith e Grotelueschen, 2004). Nos países europeus, os programas de erradicação da BVD foram desenvolvidos com base no diagnóstico e eliminação destes animais (Thomann et al., 2017; Thulke et al., 2017; Wernike et al., 2017). Esses programas têm apresentado bons resultados. No entanto, outras medidas como período de quarentena na introdução de novos animais na propriedade, bem como avaliação do status viral no rebanho, pela periódica titulação de anticorpos nos tanques de leite, também são imprescindíveis para o controle da doença nos rebanhos (Kelling et al., 2000).

O objetivo deste estudo foi estabelecer a prevalência de animais persistentemente infectados com o BVDV em rebanhos bovinos leiteiros no Estado do Paraná, Brasil.

Material e métodos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná - Brasil, sob o protocolo número 102/2017.

Localização

O estado do Paraná localiza-se na Região Sul do Brasil entre os paralelos de 22° 29' 30" e 26° 42' 59" de latitude sul, e entre as longitudes a Oeste de 48° 02' 24" e 54° 37' 38", compreendendo uma área de 199.307km². O número de vacas ordenhadas no Paraná é de 1.723.996 cabeças. O estado é o terceiro maior produtor de leite do Brasil, sendo que em 2015 a produção foi de 4.730.195 de litros, representando 14% do leite produzido no país (IBGE, 2016). Devido a representatividade do estado no setor leiteiro brasileiro, o mesmo foi escolhido para a realização do presente estudo.

Amostragem

Foram coletadas amostras de 6.465 bovinos, fêmeas, da raça Holandês. Amostraram-se animais com idade inferior a dois anos, fêmeas com mais de dois anos que não haviam tido partos na propriedade, e mães de bezerros que foram diagnosticados como persistentemente infectados. Os bovinos foram provenientes

de 40 rebanhos leiteiros, distribuídos em 10 municípios no Estado do Paraná. A coleta de amostras compreendeu o período de maio de 2015 a agosto de 2018. A Figura 1 demonstra a distribuição dos municípios onde foram realizadas as coletas.

A inclusão das propriedades no estudo foi dependente da disponibilidade e pretensão do produtor em realizar o diagnóstico dos animais persistentemente infectados com BVDV, oferecido pela Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH). Esses produtores optaram pela realização do diagnóstico devido suspeita prévia de infecção pelo BVDV decorrente de alterações reprodutivas, abortamentos e nascimento de bezerros fracos na propriedade. De 718 propriedades associadas à APCBRH 40 produtores optaram pela realização do diagnóstico. Todas as propriedades realizavam exames de brucelose e tuberculose bovina periódicos, vacina de brucelose (B19) nas fêmeas de três a oito meses, e vacinação contra febre aftosa. A Tabela 1 demonstra o número de rebanhos e amostras coletadas em cada município.

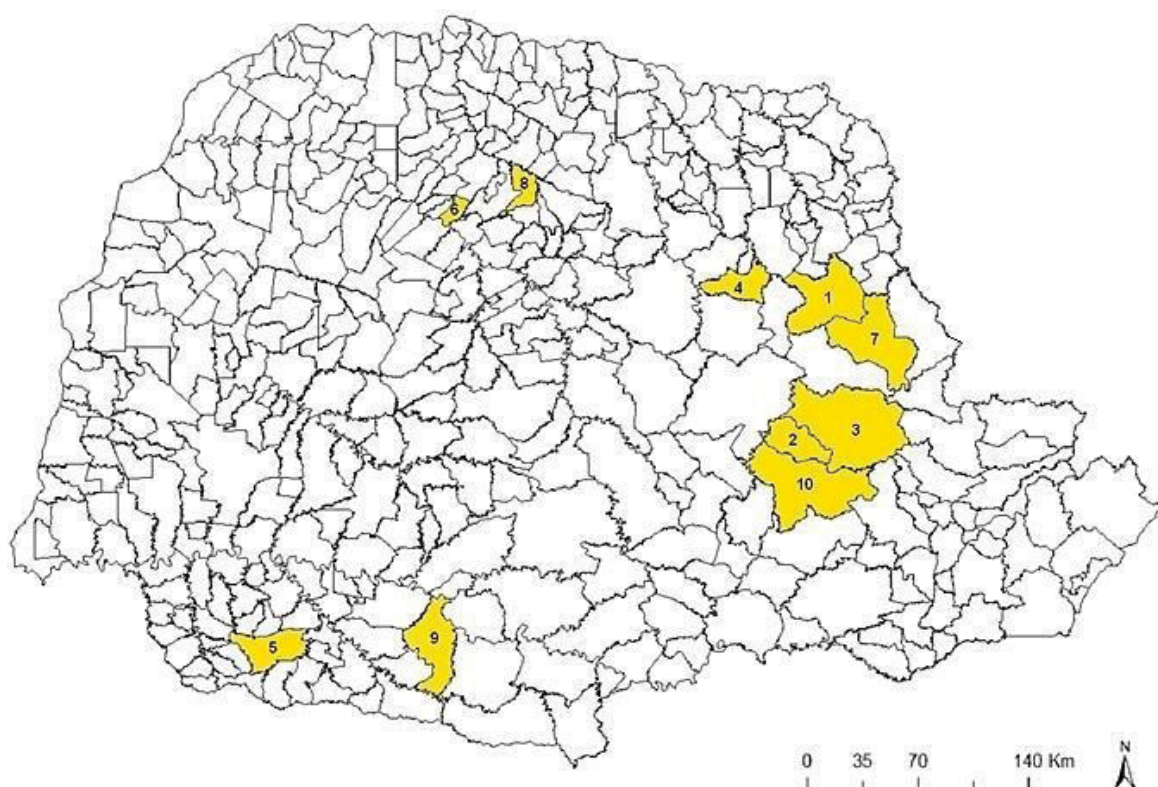


Figura 1. Localização geográfica dos municípios amostrados no Estado do Paraná
1 - Arapoti, 2 - Carambeí, 3 - Castro, 4 - Curiúva, 5 - Francisco Beltrão, 6 - Floresta,
7 - Jaguariaíva, 8 - Mandaguari, 9 - Mangueirinha, 10 - Ponta Grossa.

Tabela 1. Distribuição da coleta de amostras de fragmento de orelha para detecção de animais PI com o BVDV em municípios no estado do Paraná, Brasil.

Município	Rebanhos	Animais
Arapoti	5	1347
Carambeí	13	3078
Castro	15	1459
Curiúva	1	60
Floresta	1	179
Francisco Beltrão	1	20
Jaguariaíva	1	105
Mandaguari	1	65
Mangueirinha	1	133
Ponta Grossa	1	19
Total	40	6.465

Amostra

Foram coletados fragmentos de cartilagem auricular, que são relativamente estáveis. Os fragmentos foram coletados da extremidade da orelha, com auxílio de um mossador, e mediram aproximadamente três milímetros de diâmetro. Após a coleta, os fragmentos foram armazenados em microtubos Eppendorf® à temperatura ambiente. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Diagnóstico da APCBRH.

Pesquisa de antígeno – ELISA direto

Aos microtubos contendo a amostra foram adicionados 120-250µL da solução tampão IDEXX Ear Notch. Posteriormente estes microtubos foram selados e armazenados durante 24 horas a 26°C em câmara úmida.

Para diagnóstico dos animais persistentemente infectados com o BVDV foi utilizado o IDEXX BVDV Ag/Serum Plus Test®, que é um teste de ELISA direto, no qual se busca a detecção da proteína E^{ms} na amostra. Utilizando uma placa de 96 poços, com auxílio de uma micropipeta, foram adicionados 50µL de anticorpos de detecção em cada cavidade, além dos controles positivo e negativo.

As placas foram agitadas levemente com o intuito de homogeneizar o conteúdo das cavidades. Após homogeneização estas placas foram seladas para evitar evaporação e incubadas por duas horas a 37°C. Posteriormente foi feita remoção do conteúdo das placas lavando cada cavidade com 300µL de solução de lavagem por cinco vezes. Na última lavagem realizou-se a remoção do fluido

residual de lavagem de cada placa batendo-a levemente. Após este processo de lavagem foram adicionados 100µL de Conjugado em cada cavidade e as placas foram incubadas por 30 minutos a 25°C. Em seguida repetiu-se o processo de lavagem descrito. Posteriormente foram adicionados 100µL de Substrato TMB nº 12 em cada cavidade e as placas foram incubadas novamente por 10 minutos a 25°C. E finalizando o teste foram adicionados 100µL de Solução de Interrupção nº 3 em cada cavidade. A leitura do teste foi feita pela medição da absorbância das amostras e controles. Foram considerados animais negativos aqueles que apresentaram valores de densidade óptica < 0,2; suspeitos $\geq 0,2$ a < 0,3; e positivos $\geq 0,3$, de acordo com as orientações do fabricante.

Resultados

Foram detectados rebanhos positivos em três municípios. Os municípios de maior amostragem apresentaram maior prevalência. O número de animais positivos no teste de ELISA direto para detecção de antígeno e a prevalência de bovinos PI BVDV por município estão representados na Tabela 2. Animais PI foram detectados em quinze rebanhos amostrais (37,5%), variando entre um e dezesseis animais por rebanho. No município de Arapoti a prevalência de foi de 80% dos rebanhos amostrados (4/5), em Carambeí 54% (7/13) e em Castro 27% (4/15). Os valores de prevalência em 14 rebanhos estão descritos na Tabela 3, um dos rebanhos não consta nesta análise, devido apenas animais considerados suspeitos terem sido testados.

Tabela 2. Animais positivos no teste de detecção de antígeno, prevalência de animais PI (%), quantidade e prevalência de rebanhos positivos para BVDV.

Município	Animais positivos	Prevalência (%)	Rebanhos positivos	Prevalência de Rebanhos positivos
Arapoti	29	2,15 (29/1347)	4	80% (4/5)
Carambeí	69	2,24 (69/3078)	7	54% (7/13)
Castro	17	1,16 (17/1459)	4	26,7% (4/15)
Curiúva	0	0	0	0
Floresta	0	0	0	0
Francisco Beltrão	0	0	0	0
Jaguariaíva	0	0	0	0
Mandaguari	0	0	0	0
Mangueirinha	0	0	0	0
Ponta Grossa	0	0	0	0
Total	115	1,78	15	37,5% (15/40)

Tabela 3. Prevalência (%) de animais PI BVDV em rebanhos bovinos leiteiros em municípios do estado do Paraná, Brasil.

Município	Rebanho	Testados	Positivos	Prevalência (%)
Arapoti	1	39	3	7,7
	2	384	1	0,3
	3	362	10	2,8
	4	434	15	3,5
Carambei	5	260	3	1,2
	6	236	16	6,8
	7	413	14	3,4
	8	751	10	1,3
	9	189	4	2,1
	10	381	12	3,1
Castro	11	24	1	4,2
	12	364	1	0,3
	13	124	11	8,9
	14	441	4	0,9

Discussão

Os estudos para identificação de animais PI no Brasil ainda são escassos, havendo poucos dados de disseminação e prevalência destes animais nos rebanhos bovinos, visto a importância que os mesmos têm na epidemiologia da BVD. A escolha de diagnóstico dos animais até dois anos de idade se deve ao fato de os bovinos PI raramente sobreviverem até a idade reprodutiva (Stephenson et al., 2017). O teste de animais adultos só faz-se necessário se a fêmea ainda não teve parto na propriedade, desta forma não se tem o diagnóstico do bezerro, portanto não se consegue descartar com segurança que ela não seja PI. E no caso de positividade do bezerro, também se testa a mãe, pois mesmo que a probabilidade de um animal PI chegar à fase reprodutiva seja baixa, não se pode ignorar esta possibilidade, pois os bezerros de uma fêmea PI sempre serão PI, e dificilmente sobrevivem (Khodakaram-Tafti; Farjanikish, 2017).

No presente estudo, a prevalência de animais PI nos municípios amostrados no estado Paraná foi de 1,78%, oscilando entre 0,3 a 8,9% nos rebanhos positivos. No estado de Goiás, por meio de detecção de antígeno no teste de ELISA direto, foi obtida prevalência de 0,42% de animais PI em 960 bovinos amostrados (Brito et al, 2010). No Oeste do Paraná foi descrita por Dezen et al. (2013) prevalência de 0,29% de animais PI em rebanho de 692 bovinos, através da técnica de RT-PCR. Nos

Estados Unidos são descritas médias de prevalência mais baixas, como 0,4%, oscilando entre 0,06 e 2% (Fulton et al., 2006); 0,09% (O'Connor et al., 2007) e 0,2%, com intervalo entre 0,03 e 0,9% (Hoar et al., 2007).

A presença dos animais PI nos rebanhos representa um impacto negativo tanto no âmbito sanitário como econômico. O vírus tem capacidade de induzir à imunossupressão, tornando os animais mais susceptíveis a coinfeções causadas por bactérias, protozoários, e outros vírus (Megid et al., 2016). Desta forma são animais que adoecem com elevada frequência, gerando gastos com tratamentos recorrentes. Além disso, animais PI podem sofrer da doença das mucosas e vir a óbito rapidamente (Burgstaller et al., 2016).

Em estudo realizado nos Estados Unidos relacionando o peso de bovinos com a presença de infecção persistente por BVDV foi observado que bezerros com peso inferior a 180 kg apresentaram maior prevalência da infecção, tendo probabilidade de 2,78 vezes maior de ser PI quando comparado a bezerros com mais de 180 kg (Stephenson et al., 2017). O estudo supracitado evidencia que estes animais apresentam subdesenvolvimento e menor ganho de peso em relação aos animais saudáveis. A exposição ao BVDV pode levar a redução na taxa de concepção, abortamentos e queda na produção de leite (Houe, 2003), além disso, há pesquisa na Noruega relatando o aumento de 7% na incidência de mastite clínica em rebanhos expostos ao BVDV (Waage, 2000).

No presente estudo a prevalência de rebanhos com presença de animais PI foi de 37,5% (15/40). Em estudo na Nova Zelândia estimou-se prevalência de bovinos PI em 14,6% dos rebanhos (Thobokwe et al., 2004), nos Estados Unidos foi descrita prevalência de 3% em rebanhos selecionados aleatoriamente e 19% em rebanhos suspeitos de infecção por BVDV em cinco estados americanos (Wittum et al., 2001). Na Bélgica a identificação de animais PI foi realizada em regiões distintas, sendo que na região Norte encontrou-se prevalência em 32% dos rebanhos amostrados e no Sul 13% (Letellier et al., 2005). Estes dados demonstram que no presente estudo a prevalência foi bastante superior às descritas em outros países, este fato pode estar associado a todos os rebanhos amostrados serem suspeitos de infecção por BVDV devido ao histórico de alterações reprodutivas, abortamentos e nascimento de bezerros fracos.

O mesmo foi observado por Wittum et al. (2001) em que rebanhos suspeitos

tiveram maior ocorrência de animais PI do que rebanhos escolhidos aleatoriamente. Este fato demonstra a importância da realização do diagnóstico com base no histórico, sinais clínicos e epidemiológicos. A BVD tem diversas apresentações clínicas podendo ocorrer alterações entéricas, respiratórias ou reprodutivas (Lima et al., 2004) o que pode levar a erros no diagnóstico por descartar a possibilidade de infecção pelo BVDV caso nem todos esses sinais estejam presentes. Portanto, é imprescindível que a pesquisa por animais PI seja feita em propriedades com alguma das apresentações descritas.

No entanto, é imprescindível levar em consideração que o Brasil não possui programas de controle e erradicação contra BVD, o que também contribui para que os valores de prevalência sejam superiores. A Alemanha possui programa de erradicação de BVD desde 2011, este é definido pela identificação dos animais PI e eliminação dos mesmos dos rebanhos, com isso o país teve uma redução de propriedades com prevalência de bovinos PI de 3,44% em 2011 para apenas 0,16% em 2016 (Wernike et al., 2017). Dessa forma, nota-se como o estabelecimento de programas de erradicação pode contribuir para a redução de BVD nos rebanhos.

Os dados obtidos nesta pesquisa diferem de outros estudos realizados no Brasil e em outros países, fato este que pode estar relacionado ao maior tamanho amostral em relação aos demais trabalhos, bem como ao método de diagnóstico utilizado. O método utilizado por alguns autores é considerado de maior precisão pela identificação do RNA viral. Em estudo realizado na Polônia comparando o ELISA-Ag baseado na proteína Erns, que é uma proteína estrutural, o Real-time RT-PCR (qRT-PCR) e o teste de ELISA-Ag baseado na proteína NS3, que é uma proteína não-estrutural, observou-se que foi possível a identificação de animais PI em 89,7%, 100% e 3,4% dos casos, respectivamente (Larska et al., 2013). Em estudo prévio descreveu-se, da mesma forma, a superioridade da detecção do RNA viral em relação ao ELISA diante a presença de anticorpos maternos (Zimmer et al., 2004).

No entanto, também há estudo que afirma não haver diferença estatística entre os testes de ELISA-Ag, Imunohistoquímica (IHQ) e RT-PCR, ressaltando ainda a praticidade e segurança do ELISA, além de resultados individuais, quando comparado ao RT-PCR, em que as amostras podem ser pools (Fulton et al., 2006). Para os presentes autores, o teste de ELISA é um método eficaz na identificação de

animais PI, porém é necessário que o diagnóstico seja feito antes da colostragem ou no período de redução dos anticorpos maternos, isto é após 30 dias de idade, quando começam a sintetizar seus próprios anticorpos (Tizard, 2008), para que desta forma, não haja interferência dos mesmos no resultado do teste.

Foi observada maior prevalência de animais PI nos municípios de Arapoti, Castro e Carambeí, em relação aos demais amostrados. De acordo com Houe (2003) estima-se que em uma região endêmica o número de animais PI seja em torno de 2%, informação esta que chama a atenção diante dos resultados obtidos nesta pesquisa. Desta forma, pode-se considerar que as regiões dos municípios de Arapoti e Carambeí se caracterizam como áreas endêmicas para o BVDV.

A região destes municípios trata-se da maior bacia leiteira do estado do Paraná, sendo Castro o maior produtor de leite do país. A média de produção leiteira na região é de 5.243 litros/vaca/ano, superando a média nacional de 1.480 litros/vaca/ano (IBGE, 2016). Este fator indica que as propriedades desta região possuem sistemas de produção mais intensivos, com confinamentos de maior proporção e rebanhos maiores. De acordo com Van Campen (2010), quanto maior o rebanho, a atenção às medidas de biossegurança e saneamento torna-se insuficiente, contribuindo para a presença e circulação do vírus no rebanho. Ressalta-se, portanto, o impacto que a disseminação do BVDV, através da presença de animais PI, pode representar para estes municípios.

O diagnóstico e eliminação dos animais PI, período de quarentena na aquisição de animais e programas de vacinação, são as medidas de controle mais eficientes do vírus (Ferro et al., 2017; Letellier et al., 2005; Smith e Grotelueschen, 2004;).

Conclusão

Com a alta prevalência de animais PI observada, quando analisados os rebanhos amostrais individualmente, é possível afirmar que há uma disseminação importante do BVDV em municípios paranaenses, destacando inclusive áreas endêmicas. No entanto, como demonstrado nesse trabalho é uma estratégia que caminha a passos lentos no Brasil, considerando que a APCBRH é a primeira associação de criadores a disponibilizar esse serviço, além do número reduzido de produtores que têm se interessado em realizar o diagnóstico. Com isso, vê-se a

necessidade de medidas de conscientização dos produtores sobre a existência e importância da BVD nos rebanhos, destacando o papel dos animais PI na epidemiologia da doença, bem como o impacto econômico causado pela manutenção desses animais nos rebanhos.

Referências

ARENHART, S.; BAUERMANN, F.V.; OLIVEIRA, S.A.M.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Excreção e transmissão do vírus da diarreia viral bovina por bezerros persistentemente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.9, p.736-742, 2009.

BERENDS, I. M. G. A.; SWART, W.A.J.M.; FRANKENA, K.; MUSKENS, J.; LAM, T.J.G.M.; VAN SCHAIK, G. The effect of becoming BVDV-free on fertility and udder health in Dutch dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 84, p. 48–60, 2008.

BRITO, W.M.E.D.; ALFAIA, B.T.; CAIXETA, S.P.M.B.; RIBEIRO, A.C.C.; MIRANDA, T.M.T.; BARBOSA, A.C.V.C.; BARTHASSON, D.L.; LINHARES, D.C.; FARIA, B.O. Prevalência da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no estado de Goiás, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v.39, n.1, p.7-19, 2010.

BURGSTALLER, J.; OBRITZHAUSAR, W.; KUCHLING, S.; KOPACKA, I.; PINIOR, B.; KOFER, J. The effect of bovine viral diarrhoea virus on fertility in dairy cows: two case-control studies in the province of Styria, Austria. **Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift**, v. 129, n. 3–4, p. 103–110, 2016.

DEZEN, S.; OTONEL, R.A.A.; ALFIERI, A.F.; LUNARDI, M.; ALFIERI, A.A. Perfil da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em um rebanho bovino leiteiro de alta produção e com programa de vacinação contra o BVDV. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 2, p. 141–147, 2013.

FERRO, P. J.; FEARNEYHOUGH, M.G.; CALVERT, C.; NEILL, J.; RIDPATH, J.F. Case report: Emergence of bovine viral diarrhoea virus persistently infected calves in a semi-closed herd Case report: Emergence of bovine viral diarrhoea virus persistently infected calves in a semi-closed herd. **The Bovine Practitioner**, v. 50, n. 1, p. 28–30, 2017.

FLORES, E.F. **Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Viricas**. Santa Maria: UFSM, 1136p, 2017.

FULTON, R. W. HESSMAN, B.; JOHNSON, B.J.; RIDPATH, J.F.; SALIKI, J.T.; BURGE, L.J.; SJELOCHA, D.; CONFER, A.W.; FUNK, R.A.; PAYTON, M.E. Evaluation of diagnostic tests used for detection of bovine viral diarrhoea virus and prevalence of subtypes 1a, 1b, and 2a in persistently infected cattle entering a feedlot. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 228, n. 4, p. 578–584, 2006.

GROOMS, D.L. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Clinics North America: Food Animal Practice**, v.10, n.1, p.5-19, 2004.

HESSMAN, B.E.; FULTON, R.W.; SJEKLOCHA, D.B.; MURPHY, T.A.; RIDPATH, J.F.; PAYTON, M.E. Evaluation of economic effects and the health and performance of the general cattle population after exposure to cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus in a starter feedlot. **American Journal Veterinary Research**, v.70, n.1, p.73-85, 2009.

HESSMAN, B.E.; SJEKLOCHA, D.B.; FULTON, R.W.; RIDPATH, J.F.; JOHNSON, B.J.; McELROY, D.R. Acute bovine viral diarrhoea associated with extensive mucosal lesions, high morbidity, and mortality in a commercial feedlot. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v.24, n.2, p.397-404, 2012.

HOAR, B.R.; McQUARRY, A.C.; HIETALA, S.K. Prevalence of *Neospora caninum* and persistent infection with bovine viral diarrhoea virus in dairy-breed steers in a feedlot. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.230, n.7, p.1038-1043, 2007.

HOUE, H. Economic impact of BVDV infection in dairies. **Biologicals**, v. 31, n. 2, p. 137–143, 2003.

HOUE, H. Epidemiology of Bovine Viral Diarrhoea Virus. **Veterinary Clinics North America: Food Animal Practice**, v.11, n.3, p.521-547, 1995.

HOUE, H. Survivorship of animals persistently infected with bovine virus diarrhoea virus (BVDV). **Preventive Veterinary Medicine**, v. 15, n. 4, p. 275–283, 1993.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária municipal 2015. Rio de Janeiro: IBGE, 2016.

KELLING, C.; GROTELUESCHEN D.M.; SMITH, D.R.; BRODERSEN, B.W. Testing and management strategies for effective beef and dairy herd BVDV biosecurity programs. **Bovine Practitioner**, v. 34, n. 1, p. 13–22, 2000.

KHODAKARAM-TAFTI, A.; FARJANIKISH, G.H. Persistent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in cattle herds. **Iranian Journal Veterinary Research**, v.18, n.3, p.154-163, 2017.

KRAMPS, J.A.; VAN MAANEN, C.; VAN WETERING, G.; STIENSTRA, G.; QUAK, S.; BRINKHOF, J.; RONSHOLT, L.; NYLIN. A simple, rapid and reliable enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) specific antibodies in cattle serum, plasma and bulk milk. **Veterinary Microbiology**, v.64, n.2-3, p.135-144, 1999.

LARSKA, M.; KUTA, A.; POLAK, M.P. Evaluation of diagnostic methods to distinguish between calves persistently and transiently infected with bovine viral diarrhoea virus in respect to the presence of maternal antibodies. **Bulletin - Veterinary Institute in Pulawy**, v.57, n.3, p.311-317, 2013.

LETELLIER, C.; DE MEULEMEESTER, L.; LOMBA, M.; MIJTEN, E.; KERKHOF, P. Detection of BVDV persistently infected animals in Belgium: Evaluation of the strategy implemented. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, n. 1–2, p. 121–125, 2005.

LIMA, M.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F.S.F.; ARENHART, S. Caracterização de amostras atenuadas do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) tipos 1 e 2 para uso em vacinas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n.1, p. 35–42, 2004.

MEDGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. **Doenças Infecciosas em animais de produção e de companhia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016.

MOENNIG, V.; HOUE, H.; LINDBERG, A. BVD control in Europe: current status and perspectives. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, n. 1, p. 63–74, 2005.

NISKANEN, R.; ALENIUS, S.; LARSSON, B.; JACOBSSON, S-O. Determination of level of antibodies to bovine virus diarrhoea virus (BVDV) in bulk tank milk as a tool in the diagnosis and prophylaxis of BVDV infections in dairy herds. **Archives of virology. Supplementum**, v. 3, p. 245–251, 1991.

NISKANEN, R.; LINDBERG, A. Transmission of Bovine Viral Diarrhoea Virus by Unhygienic Vaccination Procedures, Ambient Air, and from Contaminated Pens. **Veterinary Journal**, v.165, n.2, p.125-130, 2003.

O'CONNOR, A.M.; REED, M.C.DENAGAMAGE, T.N.; YOON, K-J.; SORDEN, S.D.; COOPER, V.L. Prevalence of calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus in beef cow-calf herds enrolled in a voluntary screening project. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.230, n.11, p.1691-1696, 2007.

SMITH, D.R.; GROTELUESCHEN, D.M. Biosecurity and biocontainment of bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Clinic North America: Food Animal Practice**, v.20, n.1, p.131-149.

STAHL, K.; ALENIUS, S. BVDV control and eradication in Europe - an update. **Japanese Journal Veterinary Research**, v. 60, p. 31–39, 2012.

STEPHENSON, M. K.; WHITE, B.J.; PALOMARES, R.A.; ENGELKEN, T.J.; BROCK, K.V. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) persistently infected calves in auction markets from the southeastern United States; association between body weight and BVDV-positive diagnosis. **Professional Animal Scientist**, v. 33, n. 4, p. 426–431, 2017.

STOKSTAD, M.; LOKEN, T. Pestivirus in cattle: Experimentally induced persistent infection in calves. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 49, n. 10, p. 494–501, 2002.

THOBOKWE, G.; HEUER, C.; HAYES, D. P. Validation of a bulk tank milk antibody ELISA to detect dairy herds likely infected with bovine viral diarrhoea virus in New

Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 52, n. 6, p. 394–400, 2004.

THOMANN, B.; TSCHOPP, A.; MAGOURAS, I.; MEYLAN, M.; SCHÜPBACH-REGULA, G. Economic evaluation of the eradication program for bovine viral diarrhoea in the Swiss dairy sector. **Preventive Veterinary Medicine**, v.145, p.1-6, 2017.

THULKE, H.H.; LANGE, M.; TRATALOS, J.A.; CLEGG, T.A.; MCGRATH, G.; O'GRADY, L.; O'SULLIVAN, P.; DOHERTY, M.L.; GRAHAM, D.A.; MORE, S.J. Eradicating BVD, reviewing Irish programme data and model predictions to support prospective decision making. **Preventive Veterinary Medicine**, v.150, p.151-161, 2017.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária: Uma Introdução**. 8a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

VAN CAMPEN, H. Epidemiology and control of BVD in the U.S. **Veterinary Microbiology**, v.142, n.1-2, p.94-98, 2010.

WAAGE, S. Influence of new infection with bovine virus diarrhoea virus on udder health in Norwegian dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 43, n. 2, p. 123–135, 2000.

WERNIKE, K.; GETHMANN, J.; SCHIRRMAYER, H.; SCHRÖDER, R.; CONRATHS, F.J.; BEER, M. Six Years (2011–2016) of Mandatory Nationwide Bovine Viral Diarrhoea Control in Germany - A Success Story. **Pathogens**, v.6, n.4, 2017.

WITTUM, T.E.; GROTELUESCHEN, D.M.; BROCK, K.V.; KVASNICKA, W.G.; FLOYD, J.G.; KELLING, C.L.; ODDE, K. G. Persistent bovine viral diarrhoea virus infection in US beef herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 49, n. 1–2, p. 83–94, 2001.

ZIMMER, G.M.; VAN MAANEN, C.; DE GOEY, I.; BRINKHOF, J.; WENTINK, G.H. The effect of maternal antibodies on the detection of bovine virus diarrhoea virus in peripheral blood samples. **Veterinary Microbiology**, v.100, n.3-4, p.145-149, 2004.

5. CAPÍTULO 3

Avaliação dos sólidos do leite e contagem de células somáticas durante a eliminação de bovinos persistentemente infectados com o vírus da diarreia viral bovina em propriedades leiteiras no estado do Paraná, Brasil

Evaluation of milk solids and somatic cell count during the elimination of bovines persistently infected with bovine viral diarrhoea virus in dairy farms in Paraná State, Brazil

Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da presença de animais persistentemente infectados (PI) com o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) na contagem de células somáticas (CCS) e sólidos do leite, em propriedades leiteiras no estado do Paraná. Foram selecionadas duas propriedades para avaliação do controle leiteiro anteriormente e durante a retirada dos animais PI. Para a identificação dos animais PI, foi coletado um fragmento de orelha de cada animal e encaminhado ao laboratório de diagnóstico da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH), onde foi realizado o teste de ELISA direto. Para avaliação dos sólidos totais do leite e contagem de células somáticas foram coletadas amostras mensalmente por pessoal treinado das indústrias de laticínio. Os dados de controle leiteiro foram coletados junto à APCBRH. As propriedades foram identificadas neste estudo como A e B, na propriedade A foi detectado um total de 13 animais PI, representando uma prevalência de 3,6% (13/362), enquanto que na propriedade B foram diagnosticados 15 animais PI, apresentando prevalência de 3,5% (15/434). No ano seguinte a detecção e eliminação dos persistentemente infectados os valores de contagem de células somáticas (CCS) reduziram em ambas as propriedades. Foi notado na propriedade A, que nos anos de 2016 e 2017, período de retirada dos animais PI, redução da CCS e aumento do percentual de proteína significativo. Na propriedade B foi observado aumento no percentual de gordura, lactose e maior produção de leite no ano da retirada dos PI. No período de 12 meses anteriores e durante a retirada dos animais PI não foram observadas diferenças significativas nos percentuais de gordura, proteína e lactose, na propriedade A. Enquanto, na propriedade B, notou-se diferença apenas no percentual de gordura. As diferenças significativas encontradas na composição de sólidos do leite, CCS e na produção, podem estar relacionadas com a presença do BVDV no rebanho. Acredita-se que estes parâmetros podem alterar-se devido a presença do vírus aumentar a quantidade de células somáticas na glândula mamária, evento este que influencia diretamente os componentes do leite.

Palavras-chave: infecção persistente, BVDV, leite, contagem de células somáticas.

Abstract

This study had the objective to evaluate the influence of the presence of animals persistently infected (PI) with the bovine viral diarrhea virus (BVDV) in the somatic cell count (SCC) and milk solids, in dairy farms in Parana State. Two farms were selected to be evaluate regarding the milk control before and during the removal of the PI animals. For the identification of the PI animals an ear fragment was collected and sent to the Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH) diagnostic laboratory, where it was made the ELISA direct test. For the total milk solids and somatic cell assessment monthly samples were collected by trained staff of the milk industry. The data was received from APCBRH. The farms were identified in this study as A and B, in farm A a total of 13 PI animals were detected, representing a prevalence of 3,6% (13/362) while in farm B were diagnosed 15 PI animals, presenting prevalence of 3,5% (15/434). In the following year after detection and elimination of the PI animals the values of somatic cells count (SCC) reduced in both the farms. It was noted that in farm A, in the years 2016 and 2017,

period of removal of PI animals, the reduction of SCC and significant increase in the percentual of protein. In farm B was observed an increase in fat percentage, lactose and greater milk production in the year of PI animals removal. In the period of 12 months preceding and during the PI animal removal were not observed significant differences in the percentage of fat, protein and lactose in farm A. While in farm B it was noted differences only in the percentage of fat. The significant differences that were found in the milk solids, SCC and in production, may be related to the presence of BVDV in the herd. It is believed that this parameters may change due to the presence of the virus increased the quantity of somatic cells in the mammary gland, this event influenciates directly the milk components.

Key words: persistent infection, BVDV, milk, somatic cells count

Introdução

O leite é o alimento mais consumido no mundo, considerado como um produto de alto valor nutricional, composto por água, proteínas, gordura saturada e lactose (Guetoauche et al., 2014). Em 2016 a produção mundial foi de 798 milhões de toneladas de leite, destacando-se o Brasil como o quarto maior produtor no cenário mundial, alcançando uma produção de 34,2 milhões de toneladas (FAO/FAOSTAT, 2017). O estado do Paraná é o terceiro maior produtor nacional de leite, com uma produção em 2016 de 4,4 bilhões de litros (IBGE, 2017). No estado do Paraná destaca-se a região Centro Oriental, como uma das mais produtivas bacias leiteiras do Brasil. A média de produção das vacas na região é de 5.243 litros de leite/vaca/ano, que supera a média nacional de 1.480 litros de leite/vaca/ano (IBGE, 2017).

Além de suas qualidades nutricionais, também há preocupação em relação a qualidade sanitária do leite consumido. Uma forma de avaliar a saúde do úbere é por meio da contagem de células somáticas (CCS) (Ruegg; Pantoja, 2013). Este conjunto de células é formado por células epiteliais de descamação da glândula mamária, bem como por leucócitos (Boutinaud; Jammes, 2002). Para o controle de qualidade do leite nos rebanhos, países estabeleceram limites máximos para a CCS, nos Estados Unidos este limite é de $7,5 \times 10^5$ cels/mL (FDA, 1993), na União Europeia é de $4,0 \times 10^5$ cels/mL (Europa, 2009), no Canadá é de $5,0 \times 10^5$ cels/mL (Canadian Food Inspection Service, 2005), e no Brasil a legislação atual determina $5,0 \times 10^5$ cels/mL (Brasil, 2018).

Em uma vaca leiteira variações de CCS podem ocorrer devido a vários fatores, como quantidade de leite produzida, estágio lactacional, além das práticas

de manejo (Li et al., 2014). As células somáticas podem interferir nos componentes do leite de forma negativa, principalmente no percentual de gordura e proteína, além de alterações físico-químicas (El-Tahawy; El-Far, 2010).

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é caracterizado por seu comportamento imunossupressor, isso faz com que o sistema imunológico do animal se torne mais susceptível à ocorrência de infecções causadas por patógenos oportunistas (Chase, 2013). Atualmente estudos relacionam a presença do BVDV na propriedade com a qualidade do leite por meio da contagem de células somáticas (CCS), em que foi constatado que rebanhos leiteiros com ausência de BVDV apresentavam menor contagem de células somáticas no leite (Laureyns et al.;2013). Isto demonstra que a presença do vírus na propriedade, além de muitas outras consequências, também interfere na produção e qualidade do leite. Demonstrando a importância do diagnóstico e controle desta doença nos rebanhos leiteiros.

O animal persistentemente infectado (PI) com o BVDV é a principal forma de introdução e manutenção do vírus no rebanho, este elimina grandes quantidades de partículas virais por meio de suas secreções e excreções durante toda sua vida (Houe, 1995). Deste modo a identificação e remoção desses animais do rebanho, se torna a principal medida de controle do BVDV nos rebanhos leiteiros (Thomann et al., 2017).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da presença de animais PI com o BVDV na contagem de células somáticas (CCS) e sólidos do leite, em duas propriedades leiteiras no estado do Paraná.

Material e métodos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná - Brasil, sob o protocolo número 102/2017.

Localização

O estudo foi realizado no estado do Paraná, na mesorregião Centro Oriental Paranaense, que é formada por 14 municípios, com extensão de 21.850 km², estando a uma altitude de 890 metros. De acordo com dados do IBGE (2017) a região produziu 631 milhões de litros no ano de 2016.

Amostragem

Foram selecionadas duas propriedades para avaliação do controle leiteiro anteriormente e durante a retirada dos animais PI, o acesso às mesmas foi proporcionado pela APCBRH. A inclusão das propriedades no estudo foi dependente da disposição do produtor em participar do mesmo. As propriedades foram identificadas aqui como A e B. A propriedade A possuía um total de 640 bovinos, da raça Holandesa preto e branco, sendo 290 vacas em lactação, em sistema de confinamento Free-stall, ordenha mecânica, com três ordenhas diárias, e uma média de produção de leite de 32 litros/vaca/dia. A propriedade B possuía um total de 600 bovinos da raça Holandesa preto e branco, sendo 303 vacas em lactação, em sistema de confinamento Free-stall, ordenha mecânica, com duas ordenhas diárias, e uma média de produção de leite de 28 litros/vaca/dia.

Identificação dos animais persistentemente infectados

Todos os animais até dois anos de idade em ambas as propriedades foram testados, bem como as fêmeas com mais de dois anos mães de bezerros PI. Com isso, foram testados 362 animais na propriedade A, e 434 na propriedade B. Para o teste foi coletado um fragmento de orelha de cada animal, com o auxílio de um mossador. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Diagnóstico da APCBRH. Foi utilizado o IDEXX BVDV Ag/Serum Plus Test[®], que é um teste de ELISA direto, no qual se busca a detecção do antígeno na amostra. A leitura do teste foi feita pela medição da absorbância das amostras e controles. Foram considerados animais negativos aqueles que apresentaram valores de densidade óptica $< 0,2$; suspeitos $\geq 0,2$ a $< 0,3$; e positivos $\geq 0,3$, de acordo com as orientações do fabricante.

Amostras de leite

Para avaliação dos sólidos totais do leite e contagem de células somáticas foram coletadas amostras mensalmente por pessoal treinado das indústrias de laticínio, de acordo com as recomendações preconizadas nos manuais de Operações de Campo (Horst, 2008) e de Coleta de Amostras (Horst, 2010) do

Laboratório de Análise da Qualidade do Leite do Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros do Paraná da APCBRH. Foram coletados 70 mL de leite de cada vaca em ordenha. As amostras foram armazenadas em frascos padronizados, contendo conservante bronopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol).

Os percentuais de gordura, proteína e lactose das amostras de leite foram obtidos utilizando-se analisadores com a tecnologia da absorção diferencial de ondas infravermelhas, Bentley 2000® (Bentley Instruments, 1995a). O valor de contagem de células somáticas foi obtido da leitura do equipamento por citometria de fluxo, Somacount 500® (Bentley Instruments, 1995b), em mil células/mL.

Os dados de controle leiteiro foram coletados junto à APCBRH. Posteriormente, estes dados foram tabulados em planilhas do Microsoft®Excel.

Análise estatística

A análise dos dados foi realizada adotando-se o programa estatístico BioStat® versão 2008. Para a verificação da normalidade dos dados utilizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. A comparação de médias dos dados paramétricos foi realizada por meio do teste T-pareado. Para os dados não paramétricos foram calculadas as medianas, e os dados comparados pelo teste de Wilcoxon pareado. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

Resultados

O levantamento do número de animais PI e remoção dos mesmos, na propriedade A teve início no mês de dezembro de 2016. A decisão de iniciar o diagnóstico na propriedade se deu pelo aumento da taxa de reabsorção embrionária nas vacas, além de muitos casos de diarreia e morte no bezerreiro. Foi detectado um total de 13 animais PI, o que representa uma prevalência de 3,6% (13/362). Os animais persistentemente infectados exibiam nítida diferença para os demais animais, apresentando-se fracos, menores, e com enfermidades recorrentes, acarretando em altos custos com assistência veterinária e tratamentos sem sucesso.

O levantamento do número de animais PI retirada dos mesmos, na propriedade B teve início no mês de junho de 2017. Os produtores optaram por iniciar o diagnóstico devido ao aumento da taxa de abortamentos no ano de 2016. Foram diagnosticados 15 animais PI, apresentando prevalência de 3,5% (15/434).

As médias do controle leiteiro das propriedades A e B estão contidas nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 1. Média, desvio padrão e valores de p pelo Teste T pareado na avaliação da composição de sólidos do leite, CCS e produção leiteira durante o período de 2015, 2016 e 2017 em propriedade especializada de produção leiteira, compreendendo o período anterior e durante a retirada dos animais persistentemente infectados com o BVDV, propriedade A.

Período	Gordura	Proteína	Lactose	CCS	Produção
2015	3,58±0,37	3,19±0,05	4,64±0,05	286,08±90,92	35,73±1,15
2016	3,60±0,33	3,29±0,08	4,63±0,07	276,42±106,12	34,97±3,27
2017	3,57±0,19	3,29±0,11	4,64±0,13	147,33±24,84	36,01±1,67
Valor de p 2015 vs 2016	0,938	0,002	0,920	0,388	0,467
Valor de p 2015 vs 2017	0,880	0,008	0,876	0,002	0,656
Valor de p 2016 vs 2017	0,814	0,946	0,768	0,002	0,357

Com um nível de significância de 95%, são considerados significativos valores de $p < 0,05$.

Tabela 2. Média, desvio padrão, valores de p pelo Teste T pareado na avaliação da composição de sólidos do leite e produção leiteira. Mediana e valor de p pelo Teste de Wilcoxon pareado para CCS, durante o período de 2016, 2017 e 2018 em propriedade especializada de produção leiteira, compreendendo o período anterior e durante a retirada dos animais persistentemente infectados com o BVDV, propriedade B.

Período	Gordura	Proteína	Lactose	CCS	Produção
2016	3,90±0,22	3,37±0,06	4,56±0,07	407,5	27,34±3,27
2017	3,85±0,34	3,42±0,08	4,54±0,07	473,5	30,82±2,36
2018	4,18±0,30	3,37±0,09	4,63±0,06	320	30,24±2,17
Valor de p 2016 vs 2017	0,612	0,085	0,529	0,177	0,012
Valor de p 2016 vs 2018	0,049	0,980	0,013	0,018	0,001
Valor de p 2017 vs 2018	0,064	0,054	0,006	0,003	0,516

Com um nível de significância de 95%, são considerados significativos valores de $p < 0,05$

Tabela 3. Média, desvio padrão e valores de p pelo Teste T pareado na avaliação da composição de sólidos do leite e produção leiteira, nos períodos de 12 meses antes e durante a retirada dos animais PI, propriedade A.

Período	Gordura (%)	Proteína (%)	Lactose (%)	Produção (%)
12 meses antes retirada dos PI	3,62±0,33	3,30±0,06	4,63±0,07	34,82±3,23

($\bar{x} \pm s$)				
12 meses durante retirada dos PI ($\bar{x} \pm s$)	3,57 \pm 0,19	3,29 \pm 0,11	4,64 \pm 0,13	36,01 \pm 1,67
Valor de p	0,664	0,882	0,833	0,348

Com um nível de significância de 95%, são considerados significativos valores de $p < 0,05$.

Tabela 4. Média, desvio padrão e valores de p pelo Teste T pareado na avaliação da composição de sólidos do leite e produção leiteira, nos períodos de 12 meses antes e durante a retirada dos animais PI, propriedade B.

Período	Gordura (%)	Proteína (%)	Lactose (%)	Produção (L)
12 meses antes retirada dos PI ($\bar{x} \pm s$)	3,84 \pm 0,34	3,42 \pm 0,08	4,58 \pm 0,05	30,02 \pm 1,43
12 meses durante a retirada dos PI ($\bar{x} \pm s$)	4,18 \pm 0,22	3,40 \pm 0,08	4,57 \pm 0,09	29,54 \pm 2,51
Valor de p	0,026	0,532	0,922	0,639

Com um nível de significância de 95%, são considerados significativos valores de $p < 0,05$.

Tabela 5. Mediana e valores de p pelo teste de Wilcoxon Pareado na avaliação da CCS, nos períodos de 12 meses antes e durante a retirada dos animais PI, nas propriedades A e B.

Período	CCS ($\times 10^3$ cels/mL)	
	Propriedade A	Propriedade B
12 meses antes retirada dos PI	229,5	459
12 meses depois da retirada dos PI	146,5	397,5
Valor de p	0,002	0,18

Com um nível de significância de 95%, são considerados significativos valores de $p < 0,05$.

Discussão

Pode-se observar que no ano seguinte a detecção e eliminação dos animais PI os valores de CCS reduziram em ambas as propriedades (Tabela 1, Tabela 2), e na propriedade B o mesmo foi notado no período de 12 meses durante a retirada dos animais PI (Tabela 5).

As células da glândula mamária desempenham a função de defesa tecidual, sendo constituídas por linfócitos, macrófagos, células *Natural Killer* (NK) e em menor quantidade neutrófilos e células epiteliais de descamação (Sordillo et al., 1997). A glândula saudável possui concentração inferior a 10^5 cels/mL, sendo estas constituídas principalmente por linfócitos e macrófagos, e em menor quantidade por neutrófilos e células epiteliais de descamação (Kehrli Jr.; Shuster, 1994). De acordo com o mesmo autor esse valor de CCS pode aumentar rapidamente na presença de um processo infeccioso, superando 10^6 cels/mL, além de modificar o tipo celular

predominante, que nessa condição é representado por mais de 95% de neutrófilos. Desta forma, a CCS é utilizada como parâmetro indicativo de saúde da glândula mamária (Ruegg; Pantoja, 2013).

Os neutrófilos constituem a principal linha de defesa quando a glândula mamária é invadida por microrganismos, principalmente bactérias. Para o recrutamento dos neutrófilos vários fatores são secretados por células da glândula mamária, como prostaglandinas, leucotrienos e citocinas inflamatórias, incluindo Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), e Interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12) (Alluwaimi; Cullor, 2002). Os microrganismos possuem em sua membrana padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), esses padrões são reconhecidos pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Os principais PRRs são os do tipo Toll (TLR), estes representam um mecanismo de defesa imprescindível na glândula mamária, estando presentes na superfície das células epiteliais e fagocíticas (Carneiro et al., 2009).

Os TLR são responsáveis pelo estímulo à síntese de interferons (IFN), que são proteínas indispensáveis na defesa contra infecções virais (Peterhans; Schweizer, 2013). O BVDV não citopático atua bloqueando a síntese de IFN pelas células de defesa, conseqüentemente impedindo a resposta imune. Isto representa uma das estratégias do vírus para o estabelecimento da infecção persistente, levando a imunossupressão (Smirnova et al., 2014). O BVDV tem predileção por células do sistema imune, principalmente linfócitos, e por células epiteliais (Glew et al., 2003). Considerando esta predileção é preciso atentar-se ao fato de que esses tipos celulares são predominantes na glândula mamária sadia (Sordillo et al., 1997). Esta condição poderia sugerir que a manutenção do vírus no rebanho por meio dos animais PI pode favorecer a multiplicação viral nesses tipos celulares. Por mais que a cepa em questão não tenha efeito citopático, ela pode infectar essas células da glândula mamária e predispor a imunossupressão.

Desta forma, poderia o BVDV causar tanto uma redução inicial das células somáticas, por meio da infecção de linfócitos e células epiteliais, causando imunossupressão. E secundariamente conduzir à elevação da CCS pela migração de neutrófilos para a glândula. Este aumento se daria em resposta às infecções bacterianas oportunistas, que ocorrem devido à maior susceptibilidade da glândula.

Em estudo em rebanhos leiteiros flamengos encontraram que propriedades

com ausência do vírus BVDV apresentaram valores mais baixos de CCS (Laureyns et al., 2013). De forma semelhante em rebanhos no oeste da França constatado, que depois de prolongado tempo de exposição e circulação do vírus na propriedade ocorreu o aumento da CCS no leite (Beaudeau et al., 2005). Nas propriedades em estudo, dado semelhante foi observado, no entanto, é importante salientar que ambas as propriedades apresentaram valores de CCS dentro do limite, de $5,0 \times 10^5$ cels/mL, estabelecido por legislação brasileira (Brasil, 2018).

Foi notado na propriedade A, que nos anos de 2016 e 2017, período de retirada dos animais PI, redução da CCS e aumento do percentual de proteína significativos (Tabela 1). O leite é composto por uma variedade de proteínas, sendo que a caseína e proteínas do soro são sintetizadas por células alveolares da glândula mamária, a partir de aminoácidos oriundos do sangue, enquanto que a albumina e imunoglobulinas são produzidas pelo fígado (Fonseca; Santos, 2000). Quando ocorre o aumento da CCS pode-se verificar o aumento de proteínas no leite, não sendo um aumento benéfico, pois essa proteína é oriunda do influxo de albumina e imunoglobulinas para a glândula mamária, com o intuito de combate a infecção (Pereira et al., 1999).

Em contrapartida, também se pode verificar a redução da proteína pelo aumento da proteólise. As células somáticas aumentam a ativação do plasminogênio em plasmina, que é uma enzima proteolítica (Albenzio et al., 2005). O aumento da proteólise tem efeito negativo na qualidade do leite, além de reduzir o percentual proteico, também compromete a fabricação de seus derivados (Ramos et al., 2015).

A proteína no leite tem influência de outros fatores, principalmente nutricionais. Portanto não pode ser afirmado que o aumento de proteína ocorreu exclusivamente por conta da retirada dos PI do rebanho. No entanto, em estudo realizado para detecção de Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) em rebanho bovinos leiteiros na Irlanda, constatou-se que rebanhos positivos para o vírus, apresentaram redução tanto de gordura como de proteína no leite de quase 11 Kg/vaca/ano (Sayers, 2017). Os mecanismos e vias pelos quais o vírus pode causar tais alterações ainda precisam ser explicitados, da mesma forma verificar se esse comportamento pode ser visto em outras infecções virais, por exemplo, pelo BVDV.

Na propriedade B foi observado aumento no percentual de gordura, lactose e

maior produção de leite no ano da retirada dos PI (Tabela 2). Quando analisado o período de 12 meses anteriores e durante a retirada dos animais PI não foram observadas diferenças significativas nos percentuais de gordura, proteína e lactose, na propriedade A (Tabela 3). Enquanto, na propriedade B, notou-se diferença apenas no percentual de gordura (Tabela 4).

A presença de animais PI na propriedade, excretando ininterruptamente o vírus, faz com que o rebanho esteja em constante desafio imunológico, portanto os títulos de anticorpos mantêm-se elevados. Em pesquisa realizada por Tiwari e colaboradores (2007) em rebanhos leiteiros no Canadá, vacas de rebanhos soropositivos para o BVDV foram significativamente associadas com menor produção de leite, gordura e proteína, em comparação com vacas em rebanhos soronegativos para o BVDV. Com base nos resultados do autor supracitado, a exposição ao BVDV pode influenciar negativamente a composição do leite, o mesmo foi visto no presente estudo em uma das propriedades (B). De acordo com Kitchen (1981) a redução na produção de leite, pode aumentar o percentual de gordura, por torná-lo mais concentrado, porém em estudo mais recente realizado por Ramos et al.(2015) não foi evidenciada relação entre a CCS e a gordura do leite.

A redução da produção de leite é um sinal descrito em infecções por BVDV (Houe, 2003; Khodakaram-Tafti; Farjanikish, 2017) e no presente trabalho a propriedade B apresentou melhora na produção de leite durante a retirada dos animais PI. Porém outros fatores como alimentação, e número de vacas em lactação no período devem ser considerados.

A lactose é o componente mais estável no leite, sendo o principal constituinte osmótico deste, induzindo a excreção de água pelas células epiteliais mamárias (Lin et al., 2016). Em alguns estudos pode ser observado ou não o decréscimo da lactose com o aumento da CCS (Albenzio et al., 2005; Ramos et al., 2015). Sabe-se que na mastite o leite torna-se hiperosmótico em relação ao sangue circulante, desta forma há redução da síntese de lactose pelo desequilíbrio osmótico entre os dois meios (Prada e Silva et al., 2000). Como o aumento da secreção de lactose é induzido pela glicose, não há trabalhos evidenciando a interferência do BVDV ou outros agentes virais na indução da glicose na síntese de lactose. Podendo este fato ser atribuído a fatores nutricionais que possam ter ocorrido durante o período

avaliado.

Conclusão

Na avaliação do controle leiteiro antes e durante a retirada dos PI nas propriedades selecionadas, as diferenças significativas encontradas na composição de sólidos do leite, CCS e na produção, podem estar relacionadas com a presença do BVDV no rebanho, no entanto deve-se considerar que outros fatores influenciam estes parâmetros, como alimentação, manejo, sanidade da glândula mamária e ambiente. Acredita-se que estes parâmetros podem alterar-se devido à presença do vírus aumentar a quantidade de células somáticas na glândula mamária, evento este que influencia diretamente os componentes do leite.

Referências

ALBENZIO, M. CAROPRESE, M.; SANTILLO, A.; MARINO, R.; MUSCIO, A.; SEVI, A. Proteolytic patterns and plasmin activity in ewes' milk as affected by somatic cell count and stage of lactation. **Journal Dairy Research**, v. 72, n. 1, p. 86–92, 2005.

ALLUWAIMI, A. M.; CULLOR, J. S. Cytokines gene expression patterns of bovine milk during middle and late stages of lactation. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 49, n. 2, p. 105–110, 2002.

BEAUDEAU, F. et al. Bulk milk somatic cell counts and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in 7252 dairy herds in Brittany (western France). **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, n. 1–2, p. 163–167, 2005.

BENTLEY INSTRUMENTS. 1995a. Bentley 2000 Operator's Manual. Chaska. p.77.

BENTLEY INSTRUMENTS. 1995b. Somacount 300 Operator's Manual. Chaska. p.12.

BOUTINAUD, M.; JAMMES, H. Potential uses of milk epithelial cells: a review. **Reproduction Nutrition Development**, v. 42, n. 2, p. 133–147, 2002.

BRASIL. Instrução Normativa n. 31, de 29 de junho de 2018. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Brasília, 2 jul. 2018. Seção 1, p. 2.

CANADIAN FOOD INSPECTION SERVICE. **National Dairy Code, Production and Processing Regulations**, 4th ed., amended July, 2005. Disponível em:<http://www.dairyinfo.gc.ca/index_e.php?s1=dr-rl&s2=canada&s3=ndc_cnpl&s4=05-2005> Acesso em: 01 de março de 2019.

CARNEIRO, D. M. V. F.; DOMINGUESII, P. F.; VAZ, A. K. Imunidade inata da glândula mamária bovina: Resposta à infecção. **Ciencia Rural**, v. 39, n. 6, p. 1934–

1943, 2009.

CHASE, C. C. L. The impact of BVDV infection on adaptive immunity. **Biologicals**, v. 41, n. 1, p. 52–60, 2013.

EL-TAHAWY, A. S.; EL-FAR, A.H. Influences of somatic cell count on milk composition and dairy farm profitability. **International Journal Dairy Technology**, v. 63, n. 3, p. 463–469, 2010.

EUROPA. **Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin.** 2009. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32004R0853&qid=1551478459726&from=EN>> Acesso em: 01 de março de 2019.

FAO, Faostat - Statistics Database. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL/visualize>> Acesso em 26 de fevereiro de 2019.

FDA. **Grade “A” Pasteurized Milk Ordinance, 1993 Revision.** US Department of Health and Human Services, Washington, DC. 1993. Disponível em:<<https://www.fda.gov/downloads/food/guidanceregulation/guidancedocumentsregulatoryinformation/milk/ucm612027.pdf>> Acesso em: 01 de março de 2019.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. Qualidade do leite e controle da mastite. Lemos Editorial, São Paulo, p.175. 2000.

GLEW, E. J.; CARR, B.V.; BRACKENBURY, L.S.; HOPE, J.C.; CHARLESTON, B.; HOWARD, C.J. Differential effects of bovine viral diarrhoea virus on monocytes and dendritic cells. **Journal of General Virology**, v. 84, n. 7, p. 1771–1780, 2003.

GUETOUCHE, M. ; GUESSAS, B. ; MEDJEKAL, S. Composition and nutritional value of raw milk. **Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 10, p. 115–122, 2014.

HORST, J. A. Manual de Operações de Campo. Curitiba: Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros do Paraná - APCBRH, 2008.

HORST, J. A. Manual de Coleta de Amostras: Componentes e CCS. Curitiba: Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros do Paraná - APCBRH, 2010.

HOUE, H. Economic impact of BVDV infection in dairies. **Biologicals**, v. 31, n. 2, p. 137–143, 2003.

HOUE, H. Epidemiology of Bovine Viral Diarrhea Virus. **Veterinary Clinics North America: Food Animal Practice**, v.11, n.3, p.521-547, 1995.

IBGE. **Pesquisa da Pecuária Municipal, 2017.** Produção de origem animal do Brasil, das Grandes Regiões e das Unidades da Federação, segundo o tipo de produto de origem animal. Disponível em:<<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=resultados>> Acesso em: 01 de março de 2019.

IBGE – **Pesquisa da Pecuária municipal, 2016**. Rio de Janeiro: IBGE, 2017.

KEHRLI, M. E.; SHUSTER, D. E. Factors Affecting Milk Somatic Cells and Their Role in Health of the Bovine Mammary Gland. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 2, p. 619–627, 1994.

KHODAKARAM-TAFTI, A.; FARJANIKISH, G. H. Persistent bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection in cattle herds. **Iranian Journal Veterinary Research**, v. 18, n. 3, p. 154–163, 2017.

KITCHEN, B.I. Review of the progress of dairy science: bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. **Journal Dairy Research**, v.48, n.1, p.167-88, 1981.

LAUREYNS, J.; PIEPERS, S.; RIBBENS, S.; SARRAZIN, S.; VLIEGHER, S.; VAN CROMBRUGGE, JM.; DEWULF, J. Association between herd exposure to BVDV-infection and bulk milk somatic cell count of Flemish dairy farms. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 109, n. 1–2, p. 148–151, 2013.

LIN, Y. et al. Effects of glucose on lactose synthesis in mammary epithelial cells from dairy cow. **BMC Veterinary Research**, v. 12, n. 1, p. 1–11, 2016.

PEREIRA, A.R.; SILVA, L.F.P.; MOLON, L.K.; MACHADO, P. F. B. Efeito do nível de células somáticas sobre os constituintes do leite I-gordura e proteína. Brazilian. **Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 3, p. 121–124, 1999.

PETERHANS, E.; SCHWEIZER, M. BVDV: A pestivirus inducing tolerance of the innate immune response. **Biologicals**, v. 41, n. 1, p. 39–51, 2013.

PRADA E SILVA, L.F.; PEREIRA, A.R.; MACHADO, P.F.; SARRIÉS, G.A. Efeito do nível de células somáticas sobre os constituintes do leite II-lactose e sólidos totais. **Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n.4, 2000.

RAMOS, T.M.; COSTA, F.F.; PINTO, S.M.; ABREU, L. R. Effect of Somatic Cell Count on Bovine Milk Protein Fractions. **Journal Analytical & Bioanalytical Techniques**, v. 6, n. 5, p. 1–7, 2015.

RUEGG, P. L.; PANTOJA, J. C. F. Understanding and using somatic cell counts to improve milk quality. **Irish Journal Agricultural and Food Research**, v. 52, n. 2, p. 101–117, 2013.

SAYERS, R. G. Associations between exposure to bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) and milk production, reproductive performance, and mortality in Irish dairy herds. **Journal Dairy Science**, v. 100, n. 2, p. 1340–1352, 2017.

SMIRNOVA, N. P.; WEBB, B.T.; MCGILL, J.L.; SCHAUT, R.G.; BIELEFELDT-OHMANN, H.; VAN CAMPEN, H.; SACCO, R.E.; HANSEN, T.R. Induction of interferon-gamma and downstream pathways during establishment of fetal persistent infection with bovine viral diarrhea virus. **Virus Research**, v. 183, p. 95–106, 2014.

SORDILLO, L. M.; SHAFER-WEAVER, K.; DEROSA, D. Immunobiology of the

Mammary Gland. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 8, p. 1851–1865, 1997.

THOMANN, B.; TSCHOPP, A.; MAGOURAS, I.; MEYLAN, M.; SCHÜPBACH-REGULA, G. Economic evaluation of the eradication program for bovine viral diarrhea in the Swiss dairy sector. **Preventive Veterinary Medicine**, v.145, p.1-6, 2017.

TIWARI, A.; VANLEEUEWEN, J.A.; DOHOO, I.R.; KEEFE, G.P.; HADDAD, J.P.; TREMBLAY, R.; SCOTT, H.M.; WHITING, T. Production Effects of Pathogens Causing Bovine Leukosis, Bovine Viral Diarrhea, Paratuberculosis, and Neosporosis. **Journal Dairy Science**, v. 90, n. 2, p. 659–669, 2007.